A.O.12.104

THESE DE DOCTORAT D'ETAT
ès Sciences Naturelles
présentée
à l'Université Pierre et Marie Curie
Paris (6e)

par

Monsieur TOMA Bernard
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort

pour obtenir le grade de DOCTEUR ES SCIENCES

Sujet de la thèse :

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE IMMUNOLOGIQUE DE L'ANÉMIE INFECTIEUSE DES ÉQUIDÉS

soutenue le 17 DEC. 1975

devant le jury composé de :

Monsieur le Professeur J.-A. THOMAS, Président
Monsieur le Professeur P. GORET, Rapporteur examinateur
Monsieur le Professeur Cl. HANNOUN, Rapporteur examinateur
Monsieur le Professeur J. CHARLEMAGNE, Rapporteur examinateur
Monsieur le Maître de recherches J. ALOUF, Examinateur

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548124_0014

THESE DE DOCTORAT D'ETAT
ès Sciences Naturelles

présentée

à l'Université Pierre et Marie Curie
Paris (6e)

par

Monsieur TOMA Bernard
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort

pour obtenir le grade de DOCTEUR ES SCIENCES

Sujet de la thèse :

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE IMMUNOLOGIQUE DE L'ANÉMIE INFECTIEUSE DES ÉQUIDÉS

soutenue le

devant le jury composé de :

Monsieur le Professeur J.-A. THOMAS, Président
Monsieur le Professeur P. GORET, Rapporteur examinateur
Monsieur le Professeur Cl. HANNOUN, Rapporteur examinateur
Monsieur le Professeur J. CHARLEMAGNE, Rapporteur examinateur
Monsieur le Maître de recherches J. ALOUF, Examinateur

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A Monsieur le Professeur J. A. THOMAS

Membre de l'Institut
Directeur du Centre de physiologie cellulaire de l'Université Pierre et Marie Curie

qui a accepté la présidence de cette thèse et en a suivi la genèse avec une bienveillante attention.

Respectueux hommage.

A Monsieur le Professeur P. GORET

Membre de l'Académie de Médecine
Directeur du laboratoire des Maladies Contagieuses à l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort

mon Maître,
pour tout ce qu'il m'a apporté sur les plans scientifique et humain pendant ces douze années.

Filial témoignage de ma reconnaissance et de mon dévouement.

A Monsieur le Professeur Cl. HANNOUN
de l'Institut Pasteur

A Monsieur le Professeur J. CHARLEMAGNE
de l'Université Pierre et Marie Curie

A Monsieur le Maître de Recherches J. ALOUF
du C.N.R.S.

qui ont accepté de juger ce travail.

Hommage reconnaissant.

Il m'est agréable d'adresser mes plus vifs remerciements aux différentes personnes qui, à des titres divers, ont contribué à l'élaboration de ce travail, en particulier à :

Monsieur le Docteur J.F. BURI, Chef de Laboratoire à l'Institut de Biologie Moléculaire, Université Paris 7,

pour ses précieux conseils relatifs à l'isolement et à la purification des antigènes du virus AIE.

Monsieur S. ISCAKI, Chargé de recherches au C.N.R.S.,

pour son efficace intervention dans l'étude des précipitines anti virus AIE.

Monsieur le Docteur Vétérinaire H. LAUDE, du Laboratoire I.N.R.A. de Thiverval Grignon,

pour sa participation à l'étude des propriétés physiques des antigènes du virus AIE.

Monsieur le Docteur Vétérinaire F. ANDRE, du Laboratoire de physique et chimie biologiques et médicales de l'Ecole Vétérinaire d'Alfort,

pour son aide dans l'étude des sérums de chevaux atteints d'AIE.

Monsieur le Docteur Vétérinaire H. SALMON, du Laboratoire des maladies contagieuses de l'Ecole Vétérinaire d'Alfort,

pour nos longues et parfois fructueuses discussions à propos des recherches portant sur l'AIE.

Messieurs L. COGGINS, H. NAKAJIMA, J.E. PEARSON, W.A. MALMQUIST et les autres collègues spécialistes de l'AIE,

pour nos échanges d'idées et l'étude en commun de certains réactifs.

Monsieur le Docteur Vétérinaire E. MATHIEU, Directeur des Services Vétérinaires et Monsieur J. ROMANET, Directeur de la Société d'Encouragement,

pour les crédits accordés au laboratoire des maladies contagieuses de l'Ecole Vétérinaire d'Alfort, qui ont permis le financement de ces recherches.

Madame Annie FOURNIER

pour sa collaboration technique excellente et animée.

Mademoiselle Micheline BAILLY

pour sa collaboration technique remarquable et placide.

Madame Christiane MARY

pour son dévouement et pour le soin gracieux qu'elle a apporté à la présentation de ce travail.

Madame KLOCHENDELER

sur qui a reposé toute la responsabilité de la réalisation matérielle de ce document.

Mesdames MARECHAL, LANCELIN, GAUTHIER et GUERARD, et Monsieur QUEFFURUS,

pour leur dévouement.

ABREVIATIONS

AcA 54	Polyacrylamide 5 p cent, agarose 4 p cent
AIE	Anémie infectieuse des équidés
ARN	Acide ribonucléique
ADN	Acide desoxyribonucléique
DEAE cellulose	Diéthylaminoéthylcellulose
E.D.	Equine dermis (lignée cellulaire de derme de cheval).
EIA	Equine infectious anemia
IgT	Immunoglobuline de classe T (cheval)
IgG	Immunoglobuline de classe G.
IgA	Immunoglobuline de classe A.
IgM	Immunoglobuline de classe M.
MEM	Minimum essential medium
PBS	Phosphate buffered saline
DECP	Dose effet cytopathogène
P.M.	Poids moléculaire

INTRODUCTION

L'anémie infectieuse des équidés (AIE) est une virose animale dont l'étude comporte encore de nombreuses inconnues mais se révèle passionnante, bien que parfois déconcertante.

Le retard que l'on peut constater dans l'acquisition des connaissances portant sur le virus AIE, la pathogénie de cette maladie et l'immunité anti AIE est dû, en grande partie, à la carence persistante en moyen pratique de production du virus ou de reproduction de la maladie puisque seuls les équidés se révèlent sensibles dans les conditions naturelles ou expérimentales et qu'un système cellulaire commode n'est disponible que depuis peu de temps (MALMQUIST et coll., 1973).

Parmi les particularités de cette maladie, on peut citer la persistance régulière du virus jusqu'à la mort des animaux infectés qui peut survenir plusieurs années après la contamination, la présence simultanée et pérenne dans le sang, du virus et d'anticorps anti AIE à des taux parfois très élevés, l'absence apparente d'immunité vis-à-vis du virus hébergé, concrétisée par l'évolution de crises successives à intervalle variable, ou vis à vis d'autres souches de virus AIE, révélée par les résultats constatés à la suite de réinoculations.

Au cours de ces dernières années, cependant, des progrès ont été réalisés dans la connaissance de l'AIE grâce aux recherches effectuées par différentes équipes, en particulier américaines et japonaises. Deux faits, entre autres, méritent d'être signalés : il s'agit, tout d'abord, de la mise au point par COGGINS et NORCROSS (1970), d'une part, NAKAJIMA et coll. (1971) d'autre part, d'une technique d'immunodiffusion en gélose fondée sur l'emploi d'un antigène AIE spécifique de l'espèce virale, produit chez le cheval ou en culture cellulaire, et du sérum de chevaux infectés. Cette technique s'est révélée précieuse pour le diagnostic, le dépistage, l'épidémiologie et, par suite, la prophylaxie de l'AIE.

Par ailleurs, il s'agit de l'étude de la séro-neutralisation du virus par KONO et coll. (1973) qui a conduit ces Auteurs à la constatation de différences antigéniques entre diverses souches virales, voire, d'une variation antigénique d'une même souche au cours de l'évolution de l'infection chez un animal.

.../..

Au Laboratoire de la Chaire des maladies contagieuses de l'Ecole Vétérinaire d'Alfort, des recherches sur l'AIE ont été entreprises en 1966. Elles ont conduit à l'isolement de différentes souches virales d'AIE, à la mise au point d'une technique de culture des leucocytes de cheval, à l'isolement de souches de cytomégalovirus équins infectant les leucocytes de manière latente, enfin, au passage en série du virus AIE en culture de leucocytes de cheval.

A partir de 1971, les recherches se sont orientées vers l'étude immunologique de l'AIE. La production d'antigène AIE chez les équidés, en vue du diagnostic et de l'étude épidémiologique de l'AIE en France et en Europe, a été suivie de la purification et de l'étude des propriétés du précipitogène. Progressivement, l'existence d'un second précipitogène (nommé C, le premier étant appelé G) spécifique de l'AIE, produit en plus faible quantité chez les chevaux infectés et plus labile que le précipitogène G, a été soupçonnée, puis confirmée. Le précipitogène C produit chez le cheval ou en culture cellulaire, étudié jusqu'à présent uniquement à Alfort, a été isolé, purifié et ses propriétés physiques, chimiques et antigéniques ont été déterminées.

Parallèlement à l'étude de ces deux précipitogènes, des recherches ont été menées sur les anticorps correspondants. L'évolution du taux des précipitines anti G ou anti C au cours de l'infection expérimentale ou naturelle a été précisée. Elle a été comparée à celles du taux des anticorps anti AIE révélables par immunofluorescence indirecte et des modifications du protéinogramme sérique des équidés infectés.

Enfin, l'immunité d'équidés producteurs de sérum monospécifique anti G ou anti C, ou infectés par une souche de virus AIE a été appréciée par inoculation d'épreuve ou réinoculations successives de souches hétérologues ou homologues.

Au total, 46 équidés hébergés pendant quelques mois à plusieurs années au laboratoire des maladies contagieuses ont été utilisés pour cette étude immunologique de l'AIE.

Dans les pages qui suivent, après une première partie destinée à évoquer les connaissances relatives aux thèmes sur lesquels nous avons travaillé, nous rendons compte de nos recherches en présentant, dans une seconde partie, les matériels et techniques, dans une troisième partie, les résultats expérimentaux et, dans une dernière partie, la discussion générale précédant la conclusion.

Première partie :

IMMUNOLOGIE DE L'ANEMIE INFECTIEUSE DES EQUIDES

I - LE VIRUS DE L'ANEMIE INFECTIEUSE DES EQUIDES

Nous rappellerons brièvement les principales propriétés physico-chimiques du virus AIE, les modalités de sa culture et son pouvoir antigénique.

A/ Propriétés physico-chimiques du virus AIE

Elles ont été établies au cours de la dernière décennie, en grande partie grâce à la mise au point de techniques d'étude du virus AIE en culture cellulaire (KOBAYASHI, 1961 a, b, c).

Elles sont résumées dans le tableau I.

TABLEAU I : Principales propriétés du virus AIE.

1. Acide nucléique : ARN, mais l'ADN intervient dans la réplication du virus (NAKAJIMA et coll., 1970 ; KONO et coll., 1970).
2. Symétrie capsidale : non déterminée.
3. Enveloppe : présence d'une enveloppe de 9 nm d'épaisseur (NAKAJIMA et coll., 1969).
4. Taille et forme du virion : particules sphériques mais parfois polymorphes, de 90 à 140 nm de diamètre, hérissées de petites projections (NAKAJIMA et coll., 1969 ; ITO et coll., 1969 ; TAJIMA et coll., 1969).
5. Sensibilité aux solvants des lipides : virus sensible à l'éther (NAKAJIMA et OBARA, 1964).
6. Comportement en fonction du pH : virus sensible aux pH acides et alcalins.
7. Inactivation par la chaleur : virus inactivé après chauffage à + 56°C pendant 60 minutes.
8. Comportement vis-à-vis de la trypsine : virus résistant à l'action de la trypsine à la concentration de 0,5 mg/ml (NAKAJIMA et coll., 1969).
9. Action des rayons ultra-violets : virus assez résistant aux U.V. (dix fois plus que le virus grippal) (NAKAJIMA et coll., 1972).
10. Densité : de 1,13 à 1,16 (NAKAJIMA et coll., 1969).
11. Constante de sédimentation : 110 à 120 S (NAKAJIMA et USHIMI, 1971).

.../..

Compte tenu de ses propriétés physico-chimiques, le virus de l'AIE semble très proche des virus oncogènes à ARN et des virus Visna et Maedi.

B/ Culture du virus AIE

En dépit de nombreuses tentatives même récentes (KONO et TANIGUCHI, 1974) de culture sur différentes espèces animales, la culture du virus n'a été obtenue que chez les équidés.

En culture cellulaire, seules certaines cellules d'équidés assurent la réplication du virus.

En 1961, KOBAYASHI obtenait un effet cytopathogène sur des cultures de cellules de moelle osseuse ou de leucocytes de cheval infectées par le virus AIE. Au cours des années suivantes, KOBAYASHI et KONO (1967 a et b) précisaient les conditions nécessaires pour obtenir d'excellentes cultures de leucocytes de cheval : le choix du cheval donneur est primordial ; par ailleurs, les cultures doivent contenir une très forte concentration (supérieure à 50 p. cent) de sérum de boeuf.

Pour éviter la contamination par des cytomégalovirus présents fréquemment dans les leucocytes de chevaux sains, plusieurs solutions ont été appliquées, comme l'emploi de sérum anti cytomégalovirus dans les cultures, le contrôle de l'absence de cytomégalovirus par passages en série des leucocytes en culture de cellules de rein de lapin (USHIMI et coll., 1972) ou bien le recours à un poulain donneur de sang, élevé dans des conditions d'isolement strict et séparé de sa mère dès sa naissance (MALMQUIST et coll., 1973). En raison de ces difficultés, il n'existe qu'un très petit nombre de laboratoires dans le monde qui utilisent en routine la culture du virus AIE en culture de leucocytes de cheval.

La culture du virus AIE en culture de cellules rénales de foetus de cheval est moins délicate (NAKAJIMA, 1974 ; COGGINS, 1974).

Par ailleurs, MALMQUIST et coll. (1973) ont obtenu une réplication satisfaisante du virus sur des cellules de lignée continue "Equine Dermis" ou E.D., mais sans effet cytopathogène.

Les cellules d'autres animaux que les équidés ou d'origine humaine ont régulièrement conduit à des échecs ou à des résultats non reproductibles (MYERS et coll., 1969 ; PETROVIC et coll., 1972).

La culture du virus AIE en culture de cellules a permis d'étudier les phases et lieux de son développement. Après une période de latence d'environ 24 heures, le titre du virus augmente rapidement (KONO et coll.,

.../..

1970 ; USHIMI et coll., 1972). Les particules virales semblent se former à partir de matrices intracytoplasmiques (ITO, 1974) comme on l'observe avec les virus Visna et Maedi.

C/ Pouvoir antigénique du virus AIE

L'étude du pouvoir antigénique du virus AIE a été longtemps retardée à cause des difficultés de culture et d'obtention du virus en grande quantité.

L'infection par le virus AIE entraine la production d'anticorps qui réagissent avec le virus ou certains de ses constituants selon diverses modalités : fixation du complément, précipitation, immunofluorescence, séro-neutralisation.

Les trois premières réactions révèlent un antigène commun à toutes les souches de virus AIE isolées dans le monde et seront évoquées lors de l'étude du précipitogène et des anticorps anti AIE. La dernière, permet de distinguer chaque souche de virus AIE en fonction de l'existence d'antigène spécifique de souche, et même des phases antigéniques différentes au cours de l'évolution d'une même souche chez un équidé. Elle sera traitée lors de l'étude de l'immunité anti AIE.

La présence simultanée du virus dans le sang des équidés infectés et d'anticorps, conduit à la formation d'immuncomplexes circulants virus-anticorps dont l'existence a été démontrée par Mc GUIRE et coll. (1972) qui ont obtenu une diminution du titre viral de deux logs après traitement de sérum de cheval infecté par un sérum anti gamma globulines de cheval.

II - LE PRECIPITOGENE DU VIRUS AIE

Pendant longtemps, le pouvoir antigénique du virus AIE est resté méconnu, notamment dans le domaine de la précipitation.

Plusieurs équipes de chercheurs ont décrit des réactions de précipitation en milieu liquide ou gélifié utilisant un système AIE-sérum anti AIE : DREGUSS et LOMBARD (1954) reconnaissent l'absence de spécificité de leur technique reposant sur l'étude d'un précipitogène présent dans le sérum des chevaux infectés, à la phase d'hyperthermie.

.../..

SAXER et FUENTES (1960) ont obtenu des résultats à l'aide d'extraits de pancréas de chevaux infectés par le virus AIE comme source de précipitogène. Cependant, ces Auteurs n'ont pas indiqué la date de prélèvement du pancréas après l'infection, et les recherches ultérieures d'autres équipes n'ont pas permis d'établir une relation entre le système décrit par SAXER et FUENTES et ceux utilisés à l'heure actuelle.

Par ailleurs, MOORE et coll. (1966) ont également publié des modalités de diagnostic de l'AIE par une réaction de précipitation. Des doutes ont été rapidement émis quant à la spécificité de cette réaction et nous écrivions en 1967 : "La technique de MOORE et coll. semble reposer sur un quiproquo sérologique. On peut en effet se demander quels sont les éléments entrant réellement en jeu dans la réaction lorsqu'on analyse les conditions de préparation du sérum précipitant. Celui-ci est obtenu à la suite de l'inoculation au lapin par voie intra-veineuse d'une dose unique de 2 ml d'hématies de cheval prélevées à l'acmé thermique. Le sérum doit être recueilli le 14ème jour après l'inoculation. Si l'inoculation n'a pas lieu par voie veineuse ou bien si l'injection n'est pas unique, ou enfin si la saignée n'a pas lieu le 14ème jour... les résultats obtenus ne sont pas spécifiques".

Peu de temps après, LIVINGSTON et coll. (1966) proposaient également une technique fondée sur la recherche d'un précipitogène dans le sérum des chevaux malades, à l'aide d'un sérum obtenu par hyperimmunisation de moutons avec du virus produit en culture de leucocytes. L'expérience a prouvé que le couple obtenu n'était pas spécifique de l'AIE.

Il a fallu attendre 1970 pour voir apparaitre, avec la publication princeps de COGGINS et NORCROSS, la première description d'un système spécifique d'immunodiffusion AIE -anti AIE, suivie, quelques mois après, par la publication d'une autre technique traitant du même couple antigène-anticorps mais avec des modalités différentes de production du précipitogène (NAKAJIMA et USHIMI, 1971).

A/ Production du précipitogène

La production du précipitogène à partir du virus repose sur deux types de techniques de culture du virus :

.../..

. l'inoculation à un équidé,

. l'infection des cultures cellulaires.

1) Inoculation du virus aux équidés

Les modalités de production et de purification du précipitogène, initialement décrites par COGGINS et NORCROSS (1970) ont été ultérieurement légèrement modifiées par ces Auteurs et par diverses autres équipes.

a) A l'origine, COGGINS et NORCROSS (1970) ont inoculé la souche Wyoming ou une souche isolée dans l'Etat de New-York à des poneys et ont prélevé la rate 3 à 5 jours après le début de la maladie, qui se situait au cours de la première semaine suivant l'inoculation.

La rate était congelée, décongelée plusieurs fois, coupée finement et introduite dans des cupules creusées dans la gélose.

Dès cette époque, pour la préparation du précipitogène, COGGINS et NORCROSS insistaient sur la nécessité de choisir des poneys ayant réagi sévèrement au cours de la première semaine suivant l'inoculation et de prélever la rate après 3 à 5 jours de fièvre. Les rates prélevées plus tardivement après l'infection se montraient faiblement antigéniques sans doute à cause de la production d'anticorps venant se combiner avec le précipitogène et le masquer. Cette notion permet de comprendre l'origine des échecs essuyés par les équipes de chercheurs citées plus haut.

Ultérieurement COGGINS et coll. (1973) ont précisé quelques détails de la production du précipitogène.

Afin d'empêcher une dilution du précipitogène d'origine splénique par le sang conservé dans la rate, ces Auteurs injectent 10 ml d'adrénaline au 1/1000ème par voie intraveineuse au cheval, juste avant de le sacrifier, et tentent d'obtenir une saignée la plus complète possible en branchant un tube à vide sur la jugulaire.

Pour extraire le précipitogène, la pulpe splénique est séparée du stroma, diluée au 1/2 ou au 1/4 dans du tampon borate pH 8,6 et homogénéisée à 25.000 tours par minute pendant 4 minutes. La suspension est alors congelée et décongelée 3 fois, centrifugée à 2.600 tours par minute pendant 20 minutes et conservée congelée à -20°C ou lyophilisée.

En suivant ces modalités, COGGINS et coll. (1973) ont obtenu un précipitogène satisfaisant à partir de la rate de 17 chevaux ou poneys sur les 33 utilisés.

.../..

Différentes techniques ont été choisies par NORCROSS et COGGINS (1971) pour isoler et purifier le précipitogène à partir de l'extrait splénique.

La première est la précipitation par le sulfate d'ammonium à la concentration de 50 p. cent. Le mélange est centrifugé à 27.000 g pendant une heure et le surnageant éliminé. Le précipité est repris dans une petite quantité de tampon phosphate pH 7,2 et centrifugé à 105.000 g pendant 30 minutes. Le surnageant est considéré comme le précipitogène brut concentré.

Celui-ci est ensuite purifié en le faisant passer deux fois par un appareil d'électrophorèse à veine libre dans lequel il est introduit en permanence au rythme de 1,7 ml par heure. L'antigène est soumis à un champ électrique de 200 mA (900 kv) pendant environ 10 minutes. Le tampon de la chambre de séparation est 0,08 M tris (hydroxyméthyl) aminométhane (tris) citrate (pH 8,6). Les fractions contenant l'antigène sont mélangées, dialysées, lyophilisées pour les concentrer, puis soumises de nouveau à l'électrophorèse. Après une nouvelle lyophilisation, l'antigène est passé sur colonne de Séphadex G 200, par voie ascendante, avec un tampon Tris 0,5 M Nacl, pH 7,2. Les échantillons contenant le précipitogène sont dialysés, concentrés par lyophilisation et utilisés pour la détermination de ses propriétés.

b) HENSON et coll. (1971) ont infecté 12 poneys avec les souches Wyoming (11 poneys) et Texas (1 poney). Les animaux ont été sacrifiés entre 6 et 13 jours après l'inoculation. Deux rates seulement sur les douze formaient un précipité en gélose avec un sérum anti AIE lorsque les extraits spléniques étaient préparés par congélation-décongélation et centrifugation.

Plusieurs poneys ayant présenté une maladie sévère, peu de temps après l'inoculation, ont fourni néanmoins une rate à activité antigénique insuffisante en précipitation en gélose.

Les rates de 9 poneys (dont les deux à activité précipitante) possédaient pourtant une quantité d'antigène AIE révélé par immunofluorescence directe sensiblement identique. L'étude des sections de rate de poneys infectés, par la technique d'immunofluorescence directe avec un sérum anti AIE marqué, ne permet donc pas une bonne estimation de la valeur des extraits spléniques en tant que sources de précipitogène AIE.

Une purification partielle et une concentration des extraits spléniques ont permis de révéler la présence du précipitogène dans 7

.../..

autres rates qui n'en contenaient qu'une quantité modérée. La technique consistait tout d'abord à homogénéiser pendant 5 minutes les fragments de rate à raison de 1 gramme par millilitre de tampon phosphate (pH 7,4). La suspension splénique était alors congelée et décongelée deux fois puis centrifugée à 2.000 g pendant 10 minutes. Deux parties du surnageant étaient mélangées à une partie de trichlorotrifluoroéthane et le tout était homogénéisé pendant 5 minutes puis centrifugé pendant 15 minutes à 12.000 g. Le surnageant était précipité par le sulfate d'ammonium, (première précipitation à une concentration de 50 p. cent de sulfate d'ammonium, seconde précipitation à une concentration de 45 p. cent) et le précipité repris dans du tampon phosphate puis dialysé.

c) BOULANGER et coll. (1972) ont utilisé les modalités de COGGINS pour la production du virus mais ont employé une technique différente pour l'extraction à partir de la rate.

En 1972, ces Auteurs avaient inoculé la souche Wyoming à 24 poneys ou chevaux pour la production d'antigène. L'inoculum variait de 5 à 150 ml de sang ou de sérum. Les équidés ont été sacrifiés ou sont morts entre le 18ème jour et le 22ème jour suivant l'inoculation après avoir présenté une réaction clinique d'intensité variable. Sur les 24 équidés, 9 seulement ont fourni une rate contenant suffisamment d'antigène pour pouvoir être employée dans le test d'immunodiffusion en gélose. En particulier, malgré une fièvre élevée pendant 3 à 6 jours et un sacrifice au 9ème ou 10ème jour après l'inoculation, plusieurs équidés n'ont fourni qu'une rate de très faible activité antigénique.

Aussi, il parait difficile à ces Auteurs de prévoir correctement la valeur de l'activité de l'extrait splénique d'après l'allure de la réaction clinique de l'équidé.

BOULANGER et coll. (1972) ont proposé deux procédés d'extraction de l'antigène à partir de la rate : un procédé long et un procédé simplifié.

Le premier avait déjà été appliqué par ces Auteurs pour l'obtention d'antigène du virus de la peste bovine à partir d'organes de bovins infectés. 10 grammes de pulpe splénique sont homogénéisés en présence de 200 ml d'acétone glacée. Après 2 heures d'agitation à +9°C, la suspension est centrifugée à 1.000 g pendant 10 minutes et le culot est remis en suspension dans de l'acétone glacée. Ce procédé est répété une nouvelle

.../..

fois avec de l'acétone, puis avec un mélange à volumes égaux d'acétone et d'éther anhydre, enfin deux fois avec de l'éther anhydre seul. Après la dernière extraction, la suspension est centrifugée, le surnageant éliminé et l'éther résiduel chassé par agitation jusqu'à obtention de l'extrait splénique sous forme de poudre. Celle-ci est reprise par 20 ml d'eau physiologique et agitée pendant une nuit à +9°C. La suspension est ensuite congelée et décongelée 3 à 5 fois et de nouveau agitée en chambre froide pendant une nuit. Une centrifugation à 8.000 g destinée à éliminer la trame tissulaire fournit 10 à 15 ml d'antigène à partir des 10 grammes initiaux de pulpe splénique. L'antigène est alors congelé ou lyophilisé.

Le procédé simplifié ne comporte qu'une seule extraction par 200 ml de mélange glacé acétone-éther (au lieu de 6) suivie des mêmes opérations décrites ci-dessus.

La technique d'extraction la plus longue fournit de meilleurs résultats que la technique simplifiée. Elle permet la mise en évidence du précipitogène à partir de rates dont la pulpe possède une activité insuffisante pour faire apparaitre un précipité en gélose. Les différents extraits produits à partir d'une même rate par cette technique possèdent une activité équivalente (CARRIER et coll., 1972).

d) MORGAN (1973) congèle et décongèle dix fois les rates d'équidés infectés et soumet le surnageant obtenu après centrifugation à 30.000 g pendant 2 heures, à l'action du sulfate d'ammonium (50 p. cent). Douze équidés sur les 22 qu'il a utilisés ont fourni une rate contenant une quantité satisfaisante de précipitogène.

e) NAKAJIMA et coll. (1973) ont occasionnellement préparé du précipitogène à partir d'organes de chevaux infectés par le virus AIE, leur principale technique de production étant l'infection de cultures de leucocytes de cheval.

Un cheval a reçu une inoculation de souche Wyoming et a été sacrifié onze jours après. L'antigène a été recherché dans le sérum et dans différents organes : rate, foie, poumon, moelle osseuse, rein, ganglions lymphatiques, thymus et coeur. Ces tissus sont homogénéisés dans du tampon phosphate contenant 0,1 p. cent de tween 80. La suspension est ensuite traitée trois fois pendant 10 minutes avec trois volumes d'éther, puis la phase aqueuse est recueillie.

.../..

A l'aide de cette technique, NAKAJIMA et coll. ont mis en évidence le précipitogène, outre dans la rate, dans le foie, le poumon, la moelle osseuse et le sérum du cheval infecté mais ne l'ont pas obtenu à partir du rein, du coeur, des ganglions lymphatiques et du thymus.

f) UEDA et coll. (1973) ont également préparé le précipitogène à partir d'un cheval infecté par la souche Wyoming et sacrifié le 10ème jour, après deux jours de fièvre. La rate a été homogénéisée pendant 10 minutes dans du tampon phosphate pH 7,2 puis congelée et décongelée. Après centrifugation à 1.700 g pendant 10 minutes, le surnageant a été recueilli et le culot traité de nouveau de la même façon. L'extrait splénique a été alors amené à une concentration de 20 p. cent en sulfate d'ammonium. Le précipité a été dissous dans du tampon phosphate, dialysé et mélangé à un égal volume d'éther froid. Après agitation pendant 30 minutes à +4°C, la phase aqueuse a été recueillie, mélangée à un demi volume de trichlorotrifluoroéthane, homogénéisée pendant cinq minutes et centrifugée. Le surnageant a été passé sur une colonne de Séphadex G 100 et élué avec un tampon phosphate 0,15 M, pH 7,2.

g) HART et BROUSSARD (1973) ont proposé une technique fondée sur l'emploi du thiocyanate, permettant d'extraire une plus grande quantité de précipitogène à partir des rates. Ils ont opéré de façon comparée en traitant les mêmes quantités initiales de rate par la technique de congélation-décongélation et par la technique au thiocyanate. Six chevaux ont été utilisés, sacrifiés 10 jours après l'inoculation de la souche Wyoming.

Pour la première technique, après addition de 0,08 p. cent de $Na\ N_3$, la pulpe splénique était congelée, décongelée et centrifugée à 34.000 g pendant 30 minutes. Le culot était remis en suspension dans le surnageant, puis un nouveau cycle de congélation et de décongélation était commencé. Après le 5ème cycle, le surnageant était concentré par pervaporation et utilisé pour l'immunodiffusion.

Pour la seconde technique, des essais préliminaires ont permis de montrer que la meilleure extraction était obtenue avec une concentration de 0,5 à 0,7 M de thiocyanate. Dès lors, la pulpe splénique était amenée à cette concentration de thiocyanate, par mélange avec une solution de molarité double de celle désirée, et laissée 10 minutes à +25°C avant

.../..

dialyse. Après dialyse, la suspension était centrifugée à 27.000 g pendant 20 minutes, le surnageant récupéré et le culot lavé deux fois avec du tampon phosphate (pH 7,1). Au mélange des surnageants était ajouté un égal volume de solution de sulfate d'ammonium à saturation (pH 7,1). Après centrifugation, le précipité était dissous dans un faible volume de tampon phosphate pH 7,1 et soumis à dialyse. Après une nouvelle centrifugation, le surnageant était concentré par pervaporation à +4°C et utilisé.

Entre les mains de HART et BROUSSARD, la technique au thiocyanate s'est révélée plus particulièrement intéressante pour l'extraction du précipitogène à partir de rates ne fournissant qu'une quantité minime d'antigène par congélation-décongélation. En revanche, le gain est faible pour les rates qui donnent de bons résultats par la technique habituelle d'extraction.

h) LARS RYDEN (1975) a utilisé la technique de HART et BROUSSARD, complétée par l'action du butanol sur l'antigène, à +4°C, pendant 30 minutes.

Ainsi, on constate à l'issue de cette revue des travaux portant sur la production du précipitogène AIE *in vivo*, que cette dernière est soumise à des facteurs mal contrôlables puisqu'il est impossible de savoir *a priori* si la rate d'un équidé infecté selon des modalités bien définies, fournira ou non une quantité importante de précipitogène. Pour cette raison, elle est appelée à céder le pas à la production en culture cellulaire.

2) En culture cellulaire

Quelques mois après la publication princeps de COGGINS et NORCROSS (1970) paraissait un travail de NAKAJIMA et USHIMI (1971) décrivant les modalités de préparation du précipitogène AIE en culture de leucocytes de cheval. La preuve était ensuite rapidement apportée de l'identité du précipitogène d'origine splénique ou produit en culture cellulaire (NAKAJIMA et coll., 1972). Enfin, le précipitogène était produit dans d'autres systèmes cellulaires, comme les lignées cellulaires (MALMQUIST et coll., 1973) ou des cellules rénales de foetus de poulain (NAKAJIMA, 1974).

a) NAKAJIMA et coll. (1971) ont purifié et concentré le virus obtenu en culture de leucocytes de cheval par la séquence : ultra centrifu-

.../..

gation, passage sur DEAE cellulose et centrifugation en gradient de chlorure de césium. La suspension virale concentrée a été soumise à des cycles de congélation et de décongélation ou à l'action de l'éther pendant 5 minutes.

La suspension concentrée de virions intacts ne montre pas d'activité précipitante en gélose. En revanche, le précipitogène est décelable dans la suspension congelée et décongelée et il se trouve en plus grande quantité dans le liquide traité à l'éther.

Une modalité plus rapide de préparation du précipitogène consiste en une concentration du virus obtenu en culture cellulaire par ultra centrifugation puis par un traitement par l'éther (NAKAJIMA et USHIMI, 1972).

Ultérieurement, la technique a été encore un peu modifiée après que les Auteurs se soient aperçu que les leucocytes infectés contenaient une à trois fois plus d'antigène que les liquides de culture cellulaire. La centrifugation à 100.000 g pendant 120 minutes est donc effectuée sur le mélange de liquide de culture cellulaire et de cellules. Le culot est repris dans du tampon phosphate contenant 0,1 p. cent de twen 80 et agité pendant 10 minutes avec deux volumes d'éther. Un nouveau traitement par l'éther est réalisé après élimination de ce dernier. Actuellement les modalités utilisées par NAKAJIMA et coll. pour extraire le précipitogène à partir d'organes de chevaux infectés ou de suspensions de virus obtenu en culture de leucocytes sont donc identiques (NAKAJIMA et coll., 1973).

Enfin, récemment NAKAJIMA (1974) a préparé du précipitogène AIE à partir de cultures de cellules rénales de foetus de cheval. Les cellules rénales sont trypsinées et se multiplient pendant une dizaine de subcultures. Elles sont infectées par le virus AIE, souche P 337, au deuxième passage. Il faut attendre le huitième passage des cellules pour obtenir une production satisfaisante de virus et de précipitogène. Cette production se maintient pendant deux ou trois passages, puis les cellules dégénèrent. Les modalités d'extraction du précipitogène à partir des cultures de cellules rénales sont les mêmes que celles employées pour les cultures de leucocytes de cheval.

b) MALMQUIST et coll. (1973) ont mis au point une technique de

.../..

production du virus AIE en culture de lignée cellulaire E.D. (equine dermis ATCC 57). Par rapport aux modalités employées par NAKAJIMA et coll. sur leucocytes de cheval, elle possède le double avantage de s'adresser à une substrat commode, de qualité régulière, indemne de cytomégalovirus équins et par ailleurs, d'éviter les concentrations élevées de sérum de veau qui rendent plus délicate la purification du précipitogène.

La lignée E.D. est infectée de façon permanente par une souche de virus Wyoming ayant antérieurement subi 15 passages sur culture de leucocytes de cheval et 7 passages sur culture de cellules spléniques de foetus de cheval. Aucun effet cytopathogène n'est perceptible dans les cultures infectées ; leur taux de croissance est le même que celui des cellules E.D. témoins. Elles sont entretenues dans du milieu MEM Eagle contenant 10 p. cent de sérum de veau foetal et trypsinées une fois par semaine pour être dédoublées.

Les liquides de cultures cellulaire sont laissés pendant une nuit à +4°C en présence de poly-éthylène-glycol de poids moléculaire 6.000 à la concentration de 8 p. cent. Après centrifugation à 1.000 g pendant 30 minutes le culot est repris dans du tampon borate et soumis à agitation avec un égal volume d'éther pendant une nuit. Après élimination de l'éther, l'antigène est clarifié par centrifugation à 1.000 g pendant 30 minutes et dilué dans du tampon borate de pH 8,6.

c) UEDA et coll. (1973) emploient une technique d'extraction du précipitogène à partir de culture de leucocytes de cheval, différente de celle de NAKAJIMA et coll. (1973).

La suspension de culture de leucocytes infectés contenant 10^7 à 10^8 DECP 50/0,5 ml de virus AIE est congelée, décongelée et centrifugée à 2.300 g pendant 10 minutes. Le surnageant est dialysé contre un tampon acétate 0,01 M, de pH 5, et centrifugé à 6.500 g pendant 20 minutes. Le précipité est repris dans du tampon phosphate PBS pH 7,2, mélangé avec un égal volume d'éther froid et agité à +4°C pendant 30 minutes. Après centrifugation, la phase aqueuse est récupérée, mélangée à un demi-volume de trichlorotrifluoroéthane et homogénéisée pendant 5 minutes à +4°C. Après centrifugation à 6.500 g pendant 20 minutes, le surnageant est de nouveau soumis à dialyse contre le tampon acétate 0,01 M, pH 5, puis centrifugé à 6.500 g pendant 20 minutes. Le surnageant est passé sur

.../..

colonne de Séphadex G 100 et élué avec du tampon PBS 0,15 M, pH 7,2. Après élution et concentration à +4°C, l'activité de fixation du complément avec un sérum anti AIE est trouvée dans deux pics : P_1 et P_2 et l'activité précipitante uniquement dans le Pic P_2.

Les différentes modalités de production et d'extraction du précipitogène AIE sont rassemblées dans le tableau II.

A la lecture de ce tableau, on constate que les techniques d'extraction sont variées : cycles de congélation et de décongélation, éther, mélange acétone-éther, trichlorotrifluoroéthane, thiocyanate. Les techniques de purification sont représentées, en premier lieu, par la précipitation à l'aide du sulfate d'ammonium employée par plusieurs équipes, ainsi que par l'électrophorèse et la chromatographie sur Séphadex.

Toutes ces techniques fournissent un précipitogène accompagné d'une quantité variable de substances d'origine cellulaire n'intervenant pas dans la réaction de précipitation en milieu gélosé en présence d'un sérum anti AIE. La technique de production du précipitogène sur lignée E.D. mise au point par MALMQUIST et coll. (1973) parait être promise à une large application en raison de ses avantages.

Il convient d'évoquer maintenant les techniques d'étude du précipitogène et les résultats qu'elles ont permis d'acquérir.

B/ Techniques d'étude du précipitogène

La technique fondamentale d'identification et d'étude du précipitogène AIE est la réaction d'immunodiffusion. Pour cette raison, nous envisagerons tout d'abord les modalités techniques des réactions fondées sur l'immunodiffusion en gélose avant d'évoquer les techniques d'étude des propriétés physiques, chimiques et biologiques du précipitogène.

1) Immunodiffusion en gélose

Deux catégories de techniques d'immunodiffusion en gélose sont utilisées : la première repose sur la double diffusion et sert surtout, dans un but diagnostique , à la mise en évidence de précipitines dans le sérum de chevaux suspects d'AIE, mais permet aussi l'étude du précipitogène ; la seconde, l'immunodiffusion radiale, est une technique de mesure semi-quantitative du précipitogène, de précision limitée mais nettement supérieure à celle de la double diffusion et particulièrement précieuse pour apprécier le rendement de diverses étapes de purification, l'action

.../..

TABLEAU II : Modalités de préparation et de purification du précipitogène AIE.

Substrat pour la multiplication du virus AIE	AUTEURS	MODALITES TECHNIQUES
EQUIDES	COGGINS et NORCROSS (1970) NORCROSS et COGGINS (1971)	Congélations et décongélations de la pulpe splénique. Précipitation par le sulfate d'ammonium à 50 p. cent. Electrophorèse en veine libre. Passage sur Sephadex G 200.
	HENSON et coll. (1971)	Congélations et décongélations de la pulpe splénique. Action du trichlorotrifluoroéthane. Précipitation par le sulfate d'ammonium à 50 p. cent.
	BOULANGER et coll. (1972)	6 traitements de la pulpe splénique par de l'acétone, du mélange acétone-éther et de l'éther.
	MORGAN (1973)	Congélations et décongélations de la pulpe splénique. Précipitation par le sulfate d'ammonium à 50 p. cent.
	NAKAJIMA et coll. (1973)	Extraction par le tampon phosphate contenant 0,1 p. cen de tween 80 et par l'éther.
	UEDA et coll. (1973)	Congélations et décongélations de la pulpe splénique. Précipitation par le sulfate d'ammonium entre 20 et 50 p. cent. Traitement par l'éther et le trichlorotrifluoroéthane. Passage sur Sephadex G 100.
	HART et BROUSSARD (1973)	Traitement par thiocyanate 0,5 à 0,7 M. Précipitation par le sulfate d'ammonium à 50 p. cent.
	LARS RYDEN (1975)	Traitement par thiocyanate. Précipitation par le sulfate d'ammonium à 50 p. cent. Traitement par le butanol à +4°C pendant 30 minutes.
CULTURE CELLULAIRE	NAKAJIMA et coll. (1971, 1973) NAKAJIMA (1974)	Leucocytes ou cellules rénales de cheval. Centrifugation à 100.000 g pendant 120 minutes. Extraction par du tampon phosphate contenant 0,1 p. cen de tween 80 et par l'éther.
	MALMQUIST et coll. (1973)	Lignée cellulaire E.D. Action du polyéthylèneglycol de poids moléculaire 6.000 à concentration de 8 p. cent. Extraction par l'éther pendant une nuit.
	UEDA et coll. (1973)	Leucocytes de cheval. Congélation et décongélation. Dialyse contre du tampon acétate 0,01 M, pH 5. Action de l'éther pendant 30 minutes, puis du trichlo-rotrifluoroéthane pendant 5 minutes. Passage sur Sephadex G 100.

des agents physiques ou chimiques et la valeur de préparations d'origine différente.

a) Double diffusion

Deux grandes modalités ont été décrites, la première par COGGINS et NORCROSS en 1970, la seconde par NAKAJIMA et USHIMI en 1971, et employées telles quelles ou parfois avec de minimes différences par plusieurs équipes ; la première est réalisée en boite de Pétri, la seconde sur lame.

- En boite de Pétri

. La publication initiale de COGGINS et NORCROSS (1970) retenait les modalités suivantes : boite de Pétri de 85 mm de diamètre, recevant 23 ml de gélose à 1,5 p. cent dans un tampon borate de pH 8,6. La pulpe splénique était déposée directement dans les cupules creusées dans la gélose.
Les lignes de précipité apparaissaient après 24 heures de séjour à température du laboratoire et s'intensifiaient après 48 et 72 heures. Des précisions étaient apportées quelques mois plus tard (COGGINS et PATTEN, 1971). Une première couche de 5 ml de gélose Noble Speciale à 2 p. cent dans du tampon borate de pH 8,6 est coulée puis recouverte d'une seconde couche de 15 ml de gélose à 1 p. cent. Les puits sont creusés à l'aide d'un emporte-pièce comprenant 7 tubes (un central et six périphériques) de 7 mm de diamètre, espacés les uns des autres de 3 mm et ne pénétrant que dans la couche supérieure de gélose.

. PEARSON et le comité de l'AIE définissent en 1971 un protocole pour le test d'immunodiffusion dans l'AIE en reprenant la technique de COGGINS, fournissant tous les détails des manipulations et proposant des boites de Pétri de 100 mm de diamètre.

. HENSON et coll. (1971) se sont adressés à des modalités un peu différentes : une seule couche de gélose à 1 p. cent dans du tampon véronal pH 8,6 au lieu de deux, et des puits de 5 mm de diamètre espacés de 5 mm.

. MORGAN (1973) a utilisé également une variante de la technique de COGGINS : les deux couches sont constituées d'agarose à 1 p. cent et 0,5 p. cent dans du tampon borate pH 8,6.

.../..

. UEDA et coll. (1973) coulent 15 ml d'agarose à 0,85 p. cent dans des boites de Pétri de 80 mm de diamètre et y creusent des puits de 4 mm de diamètre distants de 4 mm.

. Enfin, d'autres Auteurs (BOULANGER et coll., 1971 ; HART et BROUSSARD, 1973 ; PAPADOPOULOS, 1973 ; PETROVIC et coll., 1973) emploient intégralement la technique de COGGINS et PATTEN (1971).

- Sur lame

. NAKAJIMA et USHIMI (1971) déposent 4,5 ml de gélose purifiée à 0,8 p. cent dans du tampon phosphate 0,01 M, pH 7,4, contenant 0,85 p. cent de Nacl et 0,01 p. cent de thimerosal sur des lames de verre pour microscopie (26 mm sur 76 mm). Les puits ont un diamètre de 3 mm et sont distants de 4 mm du puits central. Les lames sont incubées pendant 4 jours à +22°C.
Ultérieurement (1972) ces Auteurs ont légèrement modifié leur technique en augmentant le diamètre des puits (5 mm) et en les rapprochant (3 mm).

. NORCROSS et COGGINS (1971) ont également utilisé la technique sur lame pour l'étude du précipitogène. Les lames étaient recouvertes d'une fine couche d'agar à 1 p. cent dans du tampon borate pH 8,6 sur laquelle étaient disposées des petites plaques en plastique creusées de trous. Ces derniers, de 3 mm de diamètre, 5 mm de profondeur étaient distants les uns des autres de 5 mm.

. UEDA et coll. (1973) utilisent de l'agarose à 0,85 p. cent et creusent des puits de 3 mm de diamètre distants de 5 mm.

. MALMQUIST et coll. (1973) déposent 3 ml d'une suspension d'agar à 1 p. cent dans un tampon borate sur des lames de 25 mm sur 57 mm. Les puits ont 4 mm de diamètre et sont distants de 2,5 mm. Les lames sont incubées à +25°C pendant une nuit puis placées en chambre humide à la même température pendant 24 heures.

. KANASHIRO (1974) dépose 4,5 ml de gélose à 1 p. cent dans du tampon borate pH 8,6 par lame et y creuse des cupules de 5 mm de diamètre, distantes de 3 mm et pouvant recevoir 0,05 ml.

.../..

Le tableau III récapitule l'ensemble des techniques d'étude du précipitogène par double diffusion en gélose. On y constate aisément la diversité des modalités retenues par les différents Auteurs.

b) Immunodiffusion radiale

La technique d'immunodiffusion radiale n'a été que rarement employée pour l'étude du précipitogène AIE.

BOULANGER et coll. (1971) ont retenu des modalités voisines de celles de leur technique de double diffusion (cf ci-dessus). Dans la couche de gélose à 1 p. cent ils introduisent un sérum anti AIE à la dilution finale de 1/10 et ils déposent les préparations antigéniques à étudier dans les cupules.

MALMQUIST et coll. (1973) ont également adopté une variante de leur technique de dcuble diffusion en gélose en introduisant leur sérum de référence anti AIE à la concentration finale de 1/16 dans la gélose déposée sur lame. Un seul trou était ensuite réalisé par lame et la lecture du diamètre du cercle de précipité intervenait 96 heures après le dépôt de l'antigène.

2) Détermination des propriétés physiques, chimiques et biologiques

a) Etude des propriétés physiques et action des agents physiques

- Poids moléculaire

NORCROSS et COGGINS (1971) ont utilisé l'ultracentrifugation pour mesurer la constante de sédimentation et le poids moléculaire du précipitogène.

- Densité

NORCROSS et COGGINS (1971) ont déterminé la densité du précipitogène par centrifugation en gradient de chlorure de césium de 1,05 à 1,26. 0,5 ml d'antigène AIE était déposé à la surface du gradient puis centrifugé à 114.000 g pendant 16 heures. Après récupération de fractions de 0,5 ml et dialyse contre du tampon phosphate pour éliminer le chlorure de césium le précipitogène était révélé par double diffusion en gélose.

- Point isoélectrique

NORCROSS et COGGINS (1971) ont appliqué la technique d'électrofocalisation

.../..

TABLEAU III : Inventaire des modalités techniques employées pour l'étude du précipitogène AIE par double diffusion en gélose.

AUTEURS	Matériel	Gélose	Disposition des sources de réactif	Quantité de réactif	Lecture après
COGGINS et NORCROSS (1970)	Boite de Pétri de 85 mm de diamètre	23 ml de gélose à 1,5 p. cent dans du tampon borate pH 8,6	Non précisée	Non précisée pour la pulpe splénique et le sérum	2 à 3 jours à température de laboratoire en chambre humide
COGGINS et PATTEN (1971)	idem	.5ml de gélose à 2 p. cent .15ml de gélose à 1 p. cent (tampon borate pH 8,6)	7 puits de 7 mm de diamètre, espacés de 3 mm	idem	idem
PEARSON (1971) COGGINS et coll. (1973) PETROVIC et coll. (1973) PAPADOPOULOS (1973)	Boite de Pétri de 100 mm de diamètre	idem	idem	Remplissage des puits	idem
HENSON et coll. (1971)	idem	15 ml de gélose à 1 p. cent dans du tampon véronal pH 8,6	7 puits de 5 mm de diamètre espacés de 5 mm	0,03 ml par puits	idem
MORGAN (1973)	idem	.agarose à 1 p. cent dans du tampon borate pH 8,6 .agarose à 0,5 p. cent	7 puits distants de 3,5 mm	0,1 ml par puits	20 heures en chambre humide à +30°C
IEDA et coll. 1973)	Boite de Pétri de 80 mm de diamètre	15 ml d'agarose à 0,85 p. cent	Puits de 4 mm de diamètre espacés de 4 mm	Non précisée	4 jours à +22°C

NAKAJIMA et USHIMI (1971)	Lame de verre (26x76 mm)	4,5 ml de gélose à 0,8 p. cent dans du tampon phosphate pH 7,4	Puits de 3 mm de diamètre distants de 4 mm	Non précisée	4 jours à +22°C
NAKAJIMA et USHIMI (1972)	idem	idem	Puits de 5 mm de diamètre distants de 3 mm	0,05 ml par puits	idem
NORCROSS et COGGINS (1971)	Lame de verre	gélose à 1 p. cent dans du tampon borate pH 8,6	Petites plaques en plastique creusées de trous de 3 mm de diamètre, 5 mm de profondeur et distants de 5 mm	Non précisée	24 à 48 heures à température du laboratoire
UEDA et coll. (1973)	idem	Agarose à 0,85 p. cent	Puits de 3 mm de diamètre distants de 5 mm	idem	2 jours à +37°C
MALMQUIST et coll. (1973)	Lame de verre de 25 mm sur 57 mm	3 ml de gélose à 1 p. cent dans du tampon borate	Puits de 4 mm de diamètre distants de 2,5 mm	idem	Une nuit à +25°C puis 24 heures en chambre humide à +25°C
KANASHIRO (1974)	Lame de verre	4,5 ml de gélose à 1 p. cent dans du tampon borate pH 8,6	Puits de 5 mm de diamètre distants de 3 mm	0,05 ml	1 à 3 jours à température du laboratoire

ionique pour préciser le point isoélectrique du précipitogène.
La colonne contenant un gradient de pH 4 à 7 était soumise à un courant de 500 V pendant 72 heures.

- Electrophorèse et immunoélectrophorèse

NORCROSS et COGGINS (1971) ont utilisé l'électrophorèse en veine libre pour purifier le précipitogène.
UEDA et coll. (1973) ont soumis le précipitogène à l'électrophorèse en agarose à 0,85 p. cent dans du tampon véronal pH 8,6, pendant 45 minutes sous 4 mA/cm. La révélation était assurée par un sérum anti AIE.

- Action de la chaleur

Des échantillons de 0,5 ml d'antigène purifié ont été chauffés par NORCROSS et COGGINS (1971) dans un bain-marie pendant 30 minutes à +37°C, +45°C, +50°C et +60°C. Les tubes étaient ensuite immédiatement refroidis et l'activité précipitante recherchée.
UEDA et coll. (1973) ont appliqué au précipitogène purifié des températures de +40°C et +50°C pendant 30 minutes et de +60°C pendant 5 minutes.
KANASHIRO (1974) a chauffé l'antigène à +37°C et à +56°C pendant une heure.

- Action des rayons ultra-violets

L'antigène a été exposé pendant 5 à 10 minutes à une distance de 13 cm d'une lampe à rayons ultra-violets de 15 watts par KANASHIRO (1974).

b) Etude des propriétés chimiques et action des agents chimiques

L'action de diverses substances sur le précipitogène AIE a été étudiée : éther, sulfate d'ammonium, trypsine. KANASHIRO (1974) a soumis l'antigène à l'action de la trypsine à la concentration de 0,5 mg par ml pendant 2 heures à +37°C. Elle a également étudié l'action de divers acides sur l'antigène.

c) Etude des propriétés biologiques

Les propriétés biologiques du précipitogène AIE sont essentiellement d'ordre antigénique.

L'étude du pouvoir antigénique du précipitogène purifié, chez l'animal, n'a pas été signalée.

.../..

La spécificité antigénique du précipitogène produit chez les équidés ou en culture cellulaire a été comparée par différents Auteurs : NAKAJIMA et coll. (1972), UEDA et coll. (1973), MALMQUIST et coll. (1973). Le système précipitogène AIE-sérum anti a été comparé à d'autres couples spécifiques afin de déceler une éventuelle parenté antigénique : virus de l'artérite équine, virus de la peste équine, virus de la rhino-pneumonie équine, piroplasmes du cheval (COGGINS et coll., 1972), virus herpétique 2 du cheval, virus de la grippe équine A1 et A2, virus des encéphalomyélites américaines de l'Est et de l'Ouest (PEARSON et coll., 1970) virus de l'encéphalite japonaise B (NAKAJIMA 1973).

Le précipitogène AIE a été étudié vis-à-vis de sérums anti AIE dans d'autres réactions sérologiques que la précipitation, et notamment dans la fixation du complément : BOULANGER et coll. (1972), UEDA et coll. (1973).

C/ Propriétés du précipitogène AIE

Les propriétés du précipitogène AIE ont été étudiées, selon les équipes de chercheurs, après production chez les équidés ou en culture cellulaire. Le précipitogène a été obtenu sur cheval ou poney, après inoculation de souches diverses de virus AIE, à partir de plusieurs organes mais tout spécialement de la rate d'animaux sacrifiés entre le 6ème et le 13ème jour après l'inoculation. En culture cellulaire, trois types de cellules ont permis jusqu'à présent la production du précipitogène : les leucocytes de cheval, les cellules rénales de cheval et la lignée cellulaire E.D.

Sur le plan de la spécificité antigénique, NAKAJIMA et coll. (1972), UEDA et coll. (1973), MALMQUIST et coll. (1973) ont obtenu une réaction d'identité complète entre l'antigène produit en culture cellulaire et celui extrait des organes d'animaux infectés par le virus AIE.

Pour l'étude des propriétés physico-chimiques, c'est surtout l'antigène d'origine splénique qui a été utilisé. Une seule étude portant sur la comparaison de certaines propriétés physiques et chimiques du précipitogène obtenu selon les deux modalités évoquées ci-dessus, est parue (UEDA et coll., 1973). Ces Auteurs concluent que le précipitogène issu de la rate semble plus petit que celui produit en culture cellulaire d'après son comportement sur Séphadex G 100, et par ailleurs, qu'il se déplace plus rapidement vers l'anode lors d'électrophorèse en agarose à pH 8,6.

.../..

Néanmoins, pour la suite de la présentation des propriétés du précipitogène nous n'établirons pas de différence en fonction de son origine.

1) Propriétés physiques

a) La constante de sédimentation et le poids moléculaire du précipitogène ont été déterminés par ultracentrifugation : constante de sédimentation de 2,1 S et poids moléculaire de 27.500 (NORCROSS et COGGINS, 1971).

b) La densité du précipitogène a été fixée par ces mêmes Auteurs d'après l'étude en gradient de densité en chlorure de césium : 1,18.

c) Le point isoélectrique précisé par électrofocalisation ionique est de 5,8 (NORCROSS et COGGINS, 1971).
A pH 8,6 le précipitogène est faiblement chargé de façon négative (NORCROSS et COGGINS, 1971) et se déplace vers le pôle positif au cours de l'électrophorèse (UEDA et coll., 1973).

d) La sensibilité à la chaleur a été étudiée par NORCROSS et COGGINS (1971), par UEDA et coll. (1973) et par KANASHIRO (1974). L'activité du précipitogène est réduite par chauffage à + 45°C ou à +50°C pendant 30 minutes et elle est complètement détruite après 5 minutes à +60°C.

e) Les rayons ultra-violets n'altèrent pas l'activité du précipitogène (KANASHIRO, 1974).

2) Propriétés chimiques

Le précipitogène est une protéine précipitée par le sulfate d'ammonium à 50 p. cent, sensible à la trypsine (KANASHIRO, 1974) insensible à l'éther, l'acétone, le thiocyanate, le trichlorotrifluoroethane, résistant à pH 2 pendant 4 heures mais non 24 heures (KANASHIRO, 1974).

3) Propriétés biologiques

En immunodiffusion en gélose, le précipitogène mis en présence de sérum anti AIE forme un précipité décelable dès la 18ème heure et qui s'accentue au cours des 24 heures suivantes. Ultérieurement, le précipité ne se modifie pratiquement plus.

.../..

Selon les modalités techniques employées (tab. III), le seuil de détection de la présence du précipitogène dans un liquide varie. Aucune étude n'a évoqué l'activité du précipitogène par rapport à une concentration en protéines. Les Auteurs expriment la puissance de l'antigène d'après la dilution qui permet encore d'obtenir un précipité (NAKAJIMA, 1974) ou en fonction des résultats de l'immunodiffusion radiale (MALMQUIST et coll., 1973).

En présence d'une quantité suffisante d'antigène pour faire apparaître un précipité, un excès d'anticorps dans le sérum de cheval inhibe la formation du précipité. Il en est de même lors d'excès d'antigène.

Le précipitogène AIE possède une spécificité commune à toutes les souches de virus AIE. Quelle que soit la souche de virus ayant servi à la production du précipitogène en culture cellulaire ou chez l'animal on constate, en effet, une réaction d'identité en immunodiffusion en gélose (NAKAJIMA et coll., 1972 ; MALMQUIST et coll., 1973).

Aucune communauté antigénique n'a été constatée entre le précipitogène AIE et divers antigènes d'origine virale (PEARSON et coll., 1970 ; COGGINS et coll., 1972 ; NAKAJIMA, 1973).

En présence de sérum anti AIE, le précipitogène d'origine équine (NORCROSS et COGGINS, 1971) ou produit sur cellules (UEDA et coll., 1973) peut entrer dans une réaction de fixation du complément. UEDA et coll. (1973) ont montré qu'après passage de l'antigène produit en culture cellulaire sur Séphadex G 100, les fractions contenant le précipitogène étaient les seules à fixer le complément en présence d'un sérum anti AIE tandis que, dans les mêmes conditions, l'antigène extrait de la rate fournissait, en plus, un pic P1 dépourvu d'activité précipitante mais capable de fixer le complément en présence de sérum anti AIE.

Le précipitogène AIE n'est pas situé à la surface du virion : une suspension purifiée de virus AIE ne possède pas d'activité précipitante vis-à-vis d'un sérum anti AIE alors que l'activité apparait après traitement de cette suspension par l'éther qui a pour effet de détruire l'enveloppe virale et de libérer les composants internes (NAKAJIMA et USHIMI, 1971).

Le précipitogène AIE décrit par différents Auteurs est donc une

petite molécule de protéine, commune à toutes les souches de virus AIE et située à l'intérieur de la particule virale.

III - LES ANTICORPS ANTI AIE

Avant d'évoquer les résultats parus dans la littérature scientifique sur la nature des anticorps anti AIE et leur évolution au cours de l'infection par le virus, il convient de rappeler brièvement quelques connaissances sur les immunoglobulines du cheval.

A/ Les immunoglobulines du cheval

1) Généralités

Le sérum de cheval contient un grand nombre d'immunoglobulines distinctes qui peuvent, selon RAYNAUD et ISCAKI (1970), être divisées en deux groupes principaux :

. Le premier est constitué par deux classes ayant des propriétés semblables à celles des immunoglobulines d'autres espèces animales et de l'homme :
  les IgG, avec les sous-groupes IgGa, IgGb et IgGc,
  les IgM.

. Le second groupe est beaucoup plus hétérogène et correspond à des immunoglobulines ayant en commun la mobilité électrophorétique des bêta 2 globulines :
  les IgT avec les sous-groupes IgTa et IgTb,
  les "aggregating immunoglobulins" ou "AI" ou IgB ou IgI,
  une bêta 2 globuline 10 S,
  trois autres immunoglobulines : Igx, Igy et Igz,
  l'immunoglobuline A ou IgA.

2) Etude systématique

. Les IgG équines ont un poids moléculaire de 150.000 ; elles donnent une courbe de précipitation quantitative de type précipitine et fixent le complément. Elles sont divisées en 3 sous-classes.

.../..

- Les IgM équines ont un poids moléculaire de 990.000 et une constante de sédimentation de 19,8 S.

- Les IgT ont un poids moléculaire de 150.000 et une constante de sédimentation de 7 S. Elles fournissent une courbe de précipitation quantitative particulière, de type floculation et ne fixent pas le complément. La fraction IgT est le support de l'activité antitoxique dans les hyperimmun sérums de chevaux.

- Les IgI (LAVERGNE et RAYNAUD, 1973) ou IgB (SANDOR et AUDIBERT, 1970) ont un poids moléculaire de 160.000 et une constante de sédimentation de 7 S en solution saline concentrée (6 p. cent de Nacl). En milieu de force ionique faible, elles ont tendance à s'agréger ("aggregating immunoglobulins" ou AI) et leur constante de sédimentation augmente : 9 S, 11 S, 13 S. Elles fournissent une courbe de précipitation quantitative de type précipitine et ne fixent pas le complément.
  Le taux des IgI est élevé dans les sérums antibactériens.

- La bêta 2 immunoglobuline 10 S ou gamma 1 10 S est encore mal connue. Des études complémentaires sont nécessaires pour préciser ses relations avec les autres bêta 2 immunoglobulines du cheval, en particulier les IgI.

- L'Igz appartient aux IgG ; Igx et Igy sont mal connues.

- L'IgA enfin, a été surtout mise en évidence dans le colostrum de la jument (AUDIBERT et SANDOR, 1972). Elle se trouve en faible quantité dans le sérum et son coefficient de sédimentation est de 7 S.

Ainsi, le sérum de cheval contient une grande diversité d'immunoglobulines dont certaines bien connues et prépondérantes comme les IgG, les IgT et les IgI.

B/ Les immunoglobulines du cheval infecté par le virus AIE

Trois réactions sérologiques essentielles permettent d'étudier les immunoglobulines des chevaux infectés par le virus AIE : la fixation du complément, la séro-neutralisation et l'immunodiffusion. Nous évoquerons brièvement les résultats obtenus avec les deux premières techniques et

.../..

développerons davantage ceux découlant de l'emploi de l'immunodiffusion. Par ailleurs, on peut également utiliser l'immunofluorescence.

D'une façon générale, les anticorps révélés par la réaction de fixation du complément et par l'immunodiffusion apparaissent à peu près en même temps. Cependant, alors que les précipitines resteront ultérieurement toujours présentes et décelables, les anticorps fixant le complément diminuent après quelques semaines, puis ne peuvent plus être mis en évidence par cette technique ou seulement de façon occasionnelle.

Les anticorps neutralisants apparaissent plus tardivement que les anticorps fixant le complément ou les précipitines et demeurent présents dans le sérum jusqu'à la mort de l'animal (NAKAJIMA, 1973).

1) Anticorps fixant le complément

Les anticorps fixant le complément réagissent avec un antigène préparé en culture cellulaire (KONO et KOBAYASHI, 1966 a et b ; HENSON et coll., 1967 ; NAKAJIMA et coll., 1971 ; UEDA et coll., 1973) ou d'origine splénique (NORCROSS et COGGINS, 1971 ; Mc GUIRE et coll., 1971 ; CARRIER et coll., 1973 ; UEDA et coll., 1973).

L'étude de sérums de chevaux infectés par le virus AIE, prélevés régulièrement après l'infection, a fourni des résultats variables selon les animaux (Mc GUIRE et coll., 1971). La réaction de fixation du complément est positive dans les semaines suivant l'infection (apparition des anticorps 17 à 62 jours après l'inoculation pour KONO et KOBAYASHI, 1966 b), puis devient régulièrement négative après une période de 21 à 68 jours (KONO et KOBAYASHI, 1966) ou donne occasionnellement un résultat positif. Au contraire, la technique de fixation indirecte du complément se révèle initialement négative mais fournit ultérieurement des résultats positifs.

Le fractionnement des sérums montre que le pouvoir de fixer le complément se situe dans les IgG tandis que les IgT renferment des anticorps anti AIE incapables de fixer le complément et révélables par réaction de fixation indirecte du complément (Mc GUIRE et coll., 1971)

Initialement, les sérum de chevaux infectés par le virus AIE contiennent une majorité d'IgG. Après quelques semaines, les IgT augmentent et le résultat fourni par le sérum total sera fonction du taux respectif des IgG et des IgT.

.../..

Ainsi trois cas peuvent se présenter :

- le sérum contient surtout des IgG anti AIE et fournit une réponse positive à la réaction de fixation du complément ; ce cas est observé au début de l'infection et quelquefois plus tard ;

- le sérum ne contient que des IgT anti AIE et seule la réponse en fixation indirecte du complément est positive ; cette éventualité est fréquente après les premières semaines de l'infection ;

- enfin, le sérum peut fournir à la fois une réponse positive en fixation directe du complément et en fixation indirecte car il contient à la fois des IgG et des IgT anti AIE. Pour cette éventualité, Mc GUIRE et coll. (1971) proposent comme hypothèse que les IgG et les IgT d'un tel sérum ne sont pas dirigés contre les mêmes déterminants antigéniques et que les IgT du sérum entrent en compétition avec les IgG du sérum positif de référence dirigés contre les mêmes déterminants qu'eux.

Le déterminisme des fluctuations des IgG et des IgT anti AIE n'est pas connu.

2) Anticorps neutralisants

L'existence d'anticorps neutralisant le virus AIE avait été soupçonnée à la suite d'essais d'inoculation au cheval de mélanges virus AIE-sérum anti AIE par KALJAKOW (1940), STEIN et GATES (1950), STEIN et coll. (1955), TANAKA et SAKAKI (1962).

La mise au point du test de séro-neutralisation en culture de leucocytes de chevaux a rendu plus aisée l'étude des anticorps neutralisants et a permis à KONO (1969) ainsi qu'à KOBAYASHI et coll. (1969) de montrer que les anticorps neutralisants ne reconnaissaient que la souche de virus homologue. Il n'existe aucune réaction croisée en séro-neutralisation entre deux souches de virus AIE (KONO et coll., 1971).

Les anticorps neutralisants apparaissent 30 jours environ après l'inoculation et, ultérieurement, l'activité neutralisante du sérum semble se maintenir pendant toute la vie de l'animal.

KONO (1973) a montré qu'au cours de l'infection d'un cheval, le virus AIE subit des modifications antigéniques qui lui permettent continuellement d'échapper aux anticorps neutralisants produits par l'animal.

.../..

L'activité neutralisante est localisée dans les globulines 7 S (NAKAJIMA et coll., 1971).

3) Anticorps précipitants

a) Evolution des anticorps précipitants

- Chez l'adulte

. La date d'apparition des précipitines est appréciée diversement par différents Auteurs en fonction du nombre d'animaux utilisés, de la souche virale employée et de la dose inoculée. Les anticorps précipitants anti AIE commencent à être détectés :

de 2 à 10 jours après le premier pic thermique (NAKAJIMA et USHIMI, 1972

de 15 à 31 jours après l'inoculation (HENSON et coll., 1973),

de 11 à 25 jours après l'inoculation (MORGAN, 1973),

de 14 à 40 jours après l'inoculation (COGGINS, 1974).

Sur 57 poneys expérimentalement infectés, COGGINS et coll. (1972) ont étudié la date d'apparition des précipitines ; leurs résultats sont rassemblés dans le tableau IV. Le délai le plus long observé sur un poney a été de 45 jours.

TABLEAU IV : Date d'apparition des précipitines (COGGINS et coll., 1972).

Délai depuis l'inoculation	Pourcentage cumulé de poneys possédant des précipitines
14 jours	2 p. cent
21 jours	65 p. cent
28 jours	88 p. cent
35 jours	93 p. cent
plus de 35 jours	100 p. cent

. Le titre des précipitines varie chez les chevaux infectés par le virus AIE. Il a tendance à décroître chez les chevaux cliniquement normaux depuis plusieurs mois et à augmenter après un accès (NAKAJIMA et coll., 1974). Ces Auteurs n'ont pas constaté de différence significative du titre des précipitines chez des chevaux infectés par le virus AIE selon qu'ils possédaient ou non des sidéroleucocytes au moment du prélèvement de sang.

.../..

. Les précipitines persistent ultérieurement jusqu'à la mort de l'animal. De manière exceptionnelle (EDDY, 1973), la disparition des précipitines a été signalée chez des chevaux atteints d'AIE, après une période variable de positivité. COGGINS (1973) n'a jamais observé un tel phénomène et pense qu'il peut être lié à une insuffisance de sensibilité de la technique employée. NAKAJIMA (1973) admet cette disparition et pense que chez certains chevaux le taux des précipitines peut diminuer jusqu'à ne plus être détectable par l'immunodiffusion. HENSON (1973) propose une autre explication reposant non sur l'aspect quantitatif des anticorps mais sur un aspect qualitatif. Pour lui, des variations dans la nature des classes d'anticorps peuvent survenir (à l'instar de ce qui se passe pour la réaction de fixation du complément) et un sérum pourrait voir apparaître une quantité prédominante d'anticorps non précipitants.

- Chez le poulain

Les poulains sains nés de mère infectée ne possèdent pas d'anticorps précipitants dans leur sérum avant l'absorption du colostrum (KEMEN et COGGINS, 1972). Les précipitines apparaissent dans leur sérum au cours des heures qui suivent l'absorption du colostrum puis diminuent lentement s'ils ne s'infectent pas par le virus AIE. La plupart des poulains sains nés de mère infectée perdent leurs anticorps d'origine maternelle avant le 6ème mois. Sur 18 poulains, BURNS (1974) a constaté la disparition des précipitines entre le 65ème et le 182ème jour. Sur deux poulains, KEMEN et COGGINS (1972) ont enregistré la présence des précipitines jusqu'à l'âge de 9 mois.

b) Nature des anticorps précipitants

NAKAJIMA et coll. (1971) ont montré que l'activité précipitante du sérum de chevaux infectés par le virus AIE était située dans la fraction gamma globulinique de constante de sédimentation 7 S. Ils n'ont obtenu aucune activité avec la fraction 19 S.

c) Relations entre les anticorps neutralisants, fixant le complément et précipitants

Les anticorps neutralisants apparaissent dirigés contre des antigènes différents de celui que reconnaissent les anticorps précipitants ou fixant le complément.

.../..

Les premiers sont spécifiques de souche virale et correspondent à un antigène périphérique dont la spécificité varie avec la souche virale, voire, au cours du temps pour une même souche.

Les anticorps précipitants et ceux révélés par la réaction de fixation du complément (ou son inhibition) paraissent dirigés contre le même antigène. Leur apparition au cours de l'infection est concomitante.

Aucune étude n'a signalé les rapports éventuels entre le changement de classe d'immunoglobulines intervenant dans la fixation du complément (IgG initialement puis IgT) et l'immunodiffusion.

4) Anticorps révélés par immunofluorescence

Différents Auteurs ont étudié la réaction virus AIE - anticorps par la technique d'immunofluorescence indirecte (USHIMI et coll., 1969, 1970) ; CRAWFORD et coll., 1971 ; USHIMI et coll., 1972) ou directe (CRAWFORD et coll., 1971 ; KANASHIRO, 1974 ; KONO et YOSHINO, 1974) sur culture de leucocytes de cellules rénales ou sur frottis de rate.

En culture de leucocytes, une fluorescence apparait dans le cytoplasme 18 à 24 heures après l'inoculation (USHIMI et coll., 1972). Le nombre de cellules montrant une fluorescence augmente avec le temps et passe de 10-15 p. cent le second jour à 80 p. cent au 5ème jour (CRAWFORD et coll., 1971).

La fluorescence initiale se traduit par de petits points brillants qui ultérieurement augmentent de taille, deviennent coalescents pour former des masses homogènes. La fluorescence est surtout intense le long des membranes cytoplasmiques.

Aucune fluorescence n'est constatée dans le noyau (CRAWFORD et coll., 1971). L'étude de l'évolution cinétique des anticorps anti AIE révélables par immunofluorescence chez les équidés infectés et la détermination de leur classe n'ont pas été réalisées.

Les antigènes auxquels correspondent les anticorps révélés par immunofluorescence ne sont pas connus.

IV - ELECTROPHOREGRAMME DU SERUM DES CHEVAUX ATTEINTS d'AIE

Avant d'évoquer les modifications de l'électrophorégramme du sérum provoquées par l'infection virale, il nous faut rappeler les données obtenues chez le cheval sain.

.../..

A/ Etude électrophorétique du sérum de chevaux sains

De nombreux Auteurs ont soumis des sérums de chevaux à la technique d'électrophorèse sur papier à pH 8,6. Leurs résultats ont été colligés par CHARY et DUFOUR (1965) qui ont apporté leur contribution à cette étude.

1) Analyse des différentes fractions

a) Albumine

La fraction albumine correspond à un pic unique et bien individualisé.

b) Alpha globulines

Avec 15 p. cent environ des sérums de chevaux, CHARY et DUFOUR (1965) n'ont constaté qu'un sommet pour la zone des alpha globulines. Avec les autres sérums (85 p. cent) il est possible de distinguer deux parties dans la zone des alpha globulines : une fraction alpha 2 toujours plus importante et une fraction alpha 1 contenant environ 3 fois moins de protéines.

Dans 41 p. cent des tracés, la fraction alpha 1 est représentée par un petit pic nettement individualisé. Dans 11 p. cent des cas, on ne constate pas de pic mais on note un intervalle linéaire très net entre le pied du pic albumine et la fraction alpha 2. Enfin, dans 33 p. cent des cas, la fraction alpha 1 est marquée par un changement de pente ou un talus plus ou moins important adossé à la branche descendante de l'albumine.

c) Bêta globulines

La fraction bêta du sérum de cheval est hétérogène, plus délicate à localiser avec précision lors d'électrophorèse sur papier.

Dans environ 71 p. cent des sérums, l'identification des pics bêta 1 et bêta 2 ne soulève pas d'ambiguité, le sommet bêta 1 étant nettement plus développé que le sommet bêta 2. Dans 11 p. cent des cas, la courbe ne révèle pas de sommet identifiable à bêta 2 et on ne peut mesurer alors qu'une fraction bêta globale. Enfin, dans 16 p. cent des cas, le fragment de courbe correspondant à la fraction bêta figure un relief sinueux à trois sommets.

d) Gamma globulines

Le pic des gamma globulines est marqué d'un ou plusieurs petits mamelons dont l'emplacement n'obéit à aucun mode de groupement bien défini.

.../..

2) Résultats quantitatifs

Les proportions relatives des fractions protéiques sériques révélées par électrophorèse sur papier à pH 8,6 sont rassemblées dans le tableau V. Dans la première colonne, les nombres correspondent à la moyenne des résultats obtenus par 10 équipes différentes entre 1954 et 1961 sur un total d'environ 180 chevaux. La seconde colonne indique les résultats de l'étude de CHARY et DUFOUR (1965) portant sur 73 chevaux de selle français.

TABLEAU V : Proportions relatives de fractions protéiques révélées par l'électrophorèse sur papier, de sérums de chevaux sains.

Désignation des fractions	Moyennes des résultats colligés par CHARY et DUFOUR (1965) (en p. cent)	Résultats de CHARY et DUFOUR (1965) (en p. cent)
Albumine	40,9	42,7
Alpha globulines	15,1	15,7
alpha 1 globulines	3,9	3,7
alpha 2 globulines	11,7	12
Bêta globulines	19,4	21,8
bêta 1 globulines	13,4	15,1
bêta 2 globulines	8,9	6,9
Gamma globulines	24,7	20,1
Rapport A/G	0,70	0,75

Sur le plan quantitatif, on constate donc :

la prédominance des globulines sur l'albumine,

au sein des alpha globulines, la prédominance des alpha 2 globulines,

au sein des bêta globulines, la prédominance des bêta 1 globulines.

Cependant, ces chiffres correspondent à des moyennes et, sur un plan individuel, on peut noter des variations parfois très importantes. Ainsi par exemple, MITEV et VASSILEVA (1960) ont enregistré des limites de 9,2 p. cent et 22,7 p. cent pour le taux des gamma globulines chez les jeunes chevaux de Bulgarie.

.../..

Après ce bref rappel du protéinogramme général de sérum de cheval normal, il est possible d'évoquer celui des équidés infectés par le virus AIE.

B/ Etude électrophorétique du sérum de chevaux infectés par le virus AIE

Plusieurs Auteurs ont utilisé la technique d'électrophorèse pour étudier les modifications du protéinogramme des chevaux infectés par le virus AIE : HIRTZ (1952), KAO et coll. (1954), MITEV et VASSILEVA (1960), RUSSEL et coll. (1966), HENSON et coll. (1967), Mc GUIRE et coll. (1970), RIBEIRO-NETTO et coll. (1970), REIS (1974).

Au cours de l'AIE, le rapport Alb/Glob. a tendance à diminuer. Compris entre 0,5 et 0,8 chez le cheval sain, il tombe au dessous de 0,5 d'une manière d'autant plus marquée que l'expression clinique est intense (DREGUSS et LOMBARD, 1954). Cependant, il peut rester pendant longtemps à des valeurs normales ou y retourner après disparition des crises.

La diminution du rapport Alb/Glob. résulte de la diminution du taux des albumines (49,2 p. cent $\pm$ 4,8 pour les chevaux sains, contre 40,8 p. cent $\pm$ 6,3 pour les chevaux infectés, RIBEIRO-NETTO et coll., 1970) et de l'augmentation de celui des gamma globulines. Cette augmentation porte surtout sur la fraction comprise entre les bêta et les gamma globulines et correspond aux globulines T (DREGUSS et LOMBARD, 1954 ; DITCHFIELD, 1967). Cependant Mc GUIRE et coll. (1970) ont montré par dosage en immunodiffusion radiale des immunoglobulines de huit chevaux infectés par le virus AIE que l'hypergammaglobulinémie était hétérogène et dépendait de l'augmentation d'au moins trois classes d'immunoglobulines : IgG, IgT et IgM.

HENSON et coll. (1967) ont obtenu une moyenne du taux des gamma globulines de 19,35 p. cent chez les chevaux avant l'infection par le virus AIE et une moyenne de 28,14 p. cent après l'infection des mêmes chevaux.

L'étude d'une population homogène de 1.546 chevaux, infectée par le virus AIE, a conduit RIBEIRO-NETTO et coll. (1970) à des résultats voisins : le pourcentage des gamma globulines chez les animaux sains était de 18,2 $\pm$ 3,1 et chez les chevaux infectés de 27,4 $\pm$ 5,1. Un pourcentage de gamma globulines de 24 ou davantage est donc considéré par ces Auteurs comme un élément de suspicion de l'infection par le virus AIE. Cependant, l'augmentation des gamma globulines n'est pas régulièrement constatée et,

.../..

à l'inverse, des chevaux sains peuvent posséder plus de 24 p. cent de gamma globulines.

Ainsi MITEV et VASSILEVA (1960) ont montré que deux mois après l'infection, 37 p. cent des chevaux avaient conservé un taux normal de gamma globulines. De même, REIS (1974) a constaté que 29 p. cent de 32 chevaux possédant des précipitines anti AIE avaient un taux de gamma globulines inférieur à 24 p. cent. Inversement, 48 p. cent de 23 chevaux dépourvus de précipitines anti AIE possédaient plus de 24 p. cent de gamma globulines sériques.

Par suite, l'absence de valeur de l'étude électrophorétique du sérum de chevaux pour le diagnostic de l'AIE était bien établie (HIRTZ, 1952 ; MITEV et VASSILEVA, 1960 ; GORET et coll., 1968).

Aucune étude comparée de l'évolution des précipitines anti AIE et des modifications du protéinogramme n'a été publiée.

V - L'IMMUNITE DANS L'AIE

Dans le domaine de l'immunité, le virus de l'AIE semble se comporter d'une manière singulière au sein des virus.

Toutes les tentatives d'immunisation à l'aide de préparations contenant du virus inactivé ou modifié se sont soldées par des échecs. La résistance de chevaux infectés par une souche de virus AIE, vis-à-vis d'une nouvelle inoculation est très variable. Compte tenu de ces notions, KONO a été amené à étudier le virus AIE par la technique de séro-neutralisation en culture de leucocytes et à démontrer l'existence de variations antigéniques d'une même souche au cours de l'infection d'un animal.

Nous évoquerons, dans cet ordre, les notions essentielles se rapportant à ces trois éléments.

A/ Immunisation contre l'AIE

1) Vaccins à virus inactivé

Aucune protection n'a été obtenue avec le virus AIE inactivé par la chaleur ou divers antiseptiques : chauffage de 1 heure à +60°C ou addition de

.../..

5 p. mille de tricrésol (Commission Japonaise, 1914 ; LUHRS, 1919) de formol (RAMON et LEMETAYER, 1934), d'acide phénique, de glycérine, de bile (BALOZET, 1936). Ont échoué également les vaccins à base de pulpe de rate formolée (LEHNERT, 1929 ; QUENTIN, 1933 ; VELU et coll., 1934 ; BALOZET, 1935 ; CARRE et RINJARD, 1935 ; MITCHELL et coll., 1944) et les vaccins à base de virus adsorbé sur hydroxyde d'aluminium et formolé (MARTIN, 1939). Le plasma traité avec 0,5 p. cent de phénol (STEIN et OSTEEN, 1941) ou avec l'hydroxyde d'aluminium et formolé à 0,4 p. cent (DREGUSS et LOMBARD, 1954) est inefficace, de même que le vaccin au crystal violet et à la glycérine (BANKIER, 1945).

Un vaccin obtenu par traitement de tissus riches en éléments du système réticulo-histiocytaire au moyen des ultra-sons, de la centrifugation puis du formol est inactif vis-à-vis d'une souche de forte virulence (TABUCHI et coll., 1955).

Les deux derniers vaccins proposés n'ont pas dépassé le stade de l'étude au laboratoire : l'un est obtenu par addition de chinosol à 1 p. deux mille à une suspension d'hématies hémolysées en milieu glycériné (GUBIN et SHABUROV, 1961) l'autre par action du fréon 113 (KLIMOV et coll., 1961).

Il est donc bien établi que les préparations contenant du virus AIE inactivé ne confèrent aucune protection contre cette maladie.

2) Vaccin à virus modifié

Kono et coll. (1970 a, b) ont modifié une souche de virus AIE par passages en série sur culture de leucocytes de cheval et l'ont utilisée pour l'immunisation de chevaux.

Cette souche dérive de la souche Wyoming et a d'abord subi 24 passages sur culture de leucocytes avant d'être inoculée à un cheval (cheval H 337). A ce stade, la souche se montre parfaitement virulente. Par la technique de dilution limite, à partir du sérum du cheval H 337 est isolé un virus qui, après 3 passages en culture de leucocytes, est désigné par le sigle V 70 et a conservé intégralement sa virulence.

Le virus du sérum du cheval H 337 passé 50 fois en culture de leucocytes de cheval et cloné 4 fois à partir du 43ème passage est désigné par le sigle V 26.

Au cours des 50 passages, la virulence du virus pour le cheval a progressivement décru. Le clone V 26 n'est pas pathogène pour le cheval. Il a été injecté de 3 à 8 fois à 11 chevaux à des intervalles de 11 à 110 jours. Aucun de ces onze chevaux n'a présenté de signe clinique d'AIE.

Tous ont élaboré des anticorps neutralisant le virus entre le 60ème et le 140ème jour suivant la première injection.

Le clone V 26 et le clone V 70 sont immunologiquement identiques et fournissent une réaction croisée complète en séro-neutralisation. Huit des onze chevaux immunisés par le clone V 26 ont été éprouvés par le virus V 70. Tous ont parfaitement résisté alors que sept chevaux témoins recevant la même inoculation ont été malades.

Sept des huit chevaux immunisés puis éprouvés par le virus V 70, ainsi que les 3 chevaux immunisés et non éprouvés, ont été soumis à une inoculation de virus souche Wyoming passée en série sur le cheval. Les 10 chevaux immunisés ont présenté une AIE en tous points semblable à celle des 6 chevaux témoins infectés en même temps.

Ainsi, un clone avirulent (V 26) permet de protéger des animaux contre le clone virulent (V 70) issu de la même souche et différant par le nombre de passages en série sur culture cellulaire mais non contre un virus de la même souche (Wyoming) passé en série sur cheval.

B/ Comportement des chevaux déjà infectés

Le comportement des chevaux déjà infectés, vis-à-vis d'une nouvelle inoculation est très variable. Certains supportent parfaitement l'inoculation d'une grande quantité de virus et ne présentent aucune modification de leur état général, de leur température ou de leur hémogramme. Cette notion s'est d'ailleurs imposée depuis la publication de de KOCK (1920). D'autres chevaux, au contraire, se comportent exactement comme des animaux neufs. Nous allons passer en revue rapidement ces deux catégories de résultats.

1) Résistance des équidés

Nous mentionnerons les résultats dans l'ordre chronologique de publication. Dès 1907, CARRE et VALLEE indiquaient que : "les sujets guéris en apparence supportent sans rien présenter d'anormal des injections massives de sang virulent susceptibles de tuer à petites doses de vigoureux animaux". Ces Auteurs ont pu inoculer, en plusieurs fois, un volume total de 5.470 ml de sérum virulent à un cheval apparemment guéri sans provoquer le moindre trouble (il n'est cependant pas précisé s'il s'agit ou non du même inoculum et identique au virus de l'infection initiale).

De même, RAMON et LEMETAYER (1934) ont pu effectuer 6 réinoculations virulentes au cours d'une période de 3 ans, à un cheval "guéri" d'AIE sans noter de réaction.

.../..

Au cours de ses expériences, BALOZET (1935) a constaté à plusieurs reprises que les ânes réinoculés à l'aide de la même souche ou d'une souche différente ne réagissaient pas.

STEIN et coll. (1955) ont obtenu des résultats semblables chez des chevaux, en particulier, sur l'un d'entre eux, infecté initialement par la souche New-York puis successivement par la souche Wyoming et la souche California, ainsi que sur un autre, infecté initalement par la souche California et éprouvé ultérieurement par les souches New Hampshire, Wyoming et New-York.

TANAKA et SAKAKI (1962) n'ont enregistré aucune réaction sur un cheval initialement infecté par la souche Goshun puis apparemment guéri et infecté à plusieurs reprises par les souches Goshun et New Hampshire.

KONO et coll. (1973) ont constaté une résistance totale de 8 chevaux lors de réinoculation de la souche infectante initiale (souches utilisées : Wyoming, New Hampshire, German, Goshun). Vis-à-vis de souches hétérologues, la résistance est observée surtout chez les chevaux infectés déjà depuis plus de 300 jours avant la réinoculation. Sur la plupart d'entre eux, ils n'ont noté ni fièvre, ni virémie, ni apparition d'anticorps neutralisant la souche d'épreuve (ou les souches d'épreuve en cas d'inoculations successives).

Les résultats obtenus par KONO et coll. (1973), lors de réinfection d'équidés par une souche hétérologue de virus AIE, sont résumés dans le tableau VI. Le degré de résistance est exprimé en nombre de croix de la manière suivante :

Résistance	Apparition de la fièvre		Virémie	Production d'anticorps neutralisants
	En moins d'un mois	Après plus d'un mois		
-	+	+ ou -	+	+
+	-	+	+	+
++	-	-	+	+
+++	-	-	-	+
++++	-	-	-	-

.../..

TABLEAU VI : Relation entre la date de la première infection et la résistance à l'inoculation d'épreuve d'une souche hétérologue (KONO et coll., 1973). Chaque chiffre indique le nombre de chevaux ayant présenté le degré de résistance correspondant.

Résistance	Nombre de jours après l'infection initiale	
	90 à 220 jours	plus de 335 jours
-	1	0
+	2	1
++	0	0
+++	3	0
++++	0	5

La relation entre le degré de résistance des équidés et l'ancienneté de l'infection initiale n'est pas absolue, puisque KONO et coll. (1973) ont constaté l'évolution d'une crise d'AIE au 105ème jour après la réinoculation de virus à un cheval infecté depuis 2.413 jours.

Par ailleurs, à 3 reprises, KONO et coll. (1973) ont vu évoluer une crise d'AIE après la réinfection, mais ont isolé à partir du sang des équidés, au moment de la virémie, un virus différent de celui de l'inoculum. En particulier, après la crise, un des chevaux n'a pas produit d'anticorps neutralisant la souche d'épreuve, ce qui traduit son insensibilité à cette souche.

Il reste alors à expliquer pourquoi des équidés peuvent être résistants vis-à-vis d'une souche d'épreuve hétérologue et apparemment non résistants vis-à-vis de la souche qu'ils hébergent.

2) Sensibilité des équidés

A l'opposé de ces résultats, et obtenus parfois par les mêmes chercheurs que ci-dessus, on en relève, dans la littérature, qui traduisent la pleine sensibilité des chevaux infectés.

Il en est ainsi pour HEMPEL (1909), pour BALOZET (1934, 1935), pour ANDRIEVSKII (1939) et pour STEIN et coll. (1955).

La variabilité des réponses peut être illustrée en présentant certains résultats enregistrés chez l'âne par BALOZET (1935).

.../..

Première souche virale	Délai séparant les deux injections	Deuxième souche virale	Résultat de la seconde inoculation
BM I	48 jours	BM 2	Aucune réaction
BM I	101 jours	BM 2	AIE et mort
A	85 jours	TB	AIE et mort
A	196 jours	TB	Aucune réaction
TB	66 jours	A	AIE et mort
TB	156 jours	A	Aucune réaction

Sur 19 chevaux "guéris" et soumis à une réinoculation, ANDRIEVSKII (1939) voit évoluer la maladie chez 17, et 12 en meurent. Il en conclut que : "la plupart des chevaux guéris d'AIE réagissent à une réinfection exactement de la même manière que les chevaux sains à une première inoculation".

Sur 3 chevaux infectés par la souche Wyoming et ultérieurement réinfectés par cette même souche, STEIN et coll. (1955) constatent une absence de réaction chez deux chevaux et une crise d' AIE aiguë au 9ème jour sur le troisième.

TANAKA et SAKAKI (1962) notent la sensibilité de 2 chevaux sur les 3 apparemment guéris et soumis à des réinjections.

KONO et coll. (1973) ont constaté que les chevaux infectés depuis moins de 300 jours au moment de l'inoculation d'une souche hétérologue pouvaient présenter des signes cliniques d'AIE, une virémie et produire des anticorps neutralisant la souche d'épreuve.

Pour expliquer les différences notées en fonction de l'ancienneté de l'infection, ces Auteurs évoquent l'existence d'un double mécanisme immunitaire (cf ci-dessous).

Quoi qu'il en soit, à l'issue de cette brève revue du comportement des équidés déjà infectés, vis-à-vis d'une nouvelle inoculation, on retire une impression de grande diversité apparente des réponses fournies et ce pourtant parfois dans des conditions identiques. Par ailleurs, pour les expériences de réinoculation de souches homologues, il manque presque toujours des précisions portant notamment sur l'identité parfaite ou non des prélèvements utilisés.

.../..

C/ Phénomènes immunitaires

Des essais de séro-neutralisation du virus AIE ont été réalisés pour la première fois par KALJAKOW (1940), puis par STEIN et GATES (1950), DREGUSS et LOMBARD (1954) et TANAKA et SAKAKI (1962). Pour ces études, le révélateur du pouvoir infectieux du virus AIE était le cheval, et, par conséquent, le nombre d'expériences est resté très limité. Elles ont cependant permis de constater que le sérum de certains chevaux était capable de neutraliser parfois le virus AIE (KALJAKOW, 1940 ; STEIN et GATES, 1950 ; TANAKA et SAKAKI, 1962) ou, au contraire, était sans action (STEIN et GATES, 1950 ; DREGUSS ET LOMBARD, 1954; TANAKA et SAKAKI, 1962).

En particulier, STEIN et GATES (1950) ont constaté que le sérum d'un cheval infecté depuis longtemps par la souche Wyoming, neutralisait celle-ci alors que celui d'un cheval infecté par la souche California se révélait incapable de neutraliser la souche Wyoming et la souche New Hampshire. Ils émettaient alors l'hypothèse de l'existence de différences immunologiques entre ces 3 souches.

Un progrès décisif dans l'étude des phénomènes immunitaires de l'AIE a été réalisé lors de l'emploi de la culture de leucocytes, comme révélateur du pouvoir infectieux du virus après contact avec un sérum (KONO, 1969). Il est en effet devenu possible de multiplier les examens, de suivre la cinétique des anticorps neutralisants et de comparer entre elles diverses souches de virus AIE.

Dans un premier temps, KONO (1969) a suivi l'apparition et l'évolution des anticorps neutralisants dans le sérum de 25 chevaux infectés par l'une des quatre souches : Wyoming, New Hampshire, German et Goshun. Des anticorps neutralisants sont apparus sur 14 chevaux seulement sur les 25. Certains chevaux, même au 365ème jour après l'infection fournissaient un sérum inactif sur l'unique souche utilisée pour la révélation du pouvoir neutralisant des sérums, à savoir la souche Wyoming. Ces résultats ont conduit KONO et coll. (1971) à vérifier l'hypothèse de STEIN et GATES (1950) et à comparer en séro-neutralisation diverses souches de virus AIE : Wyoming, P 337, German, Goshun, New Hampshire, et Tokyo. Toutes ces souches pouvaient être neutralisées, mais uniquement par un sérum homologue. Une étroite spécificité de souche était donc mise en évidence pour la neutralisation du virus AIE et, à condition d'utiliser la souche de virus homologue, il était possible de suivre l'évolution des anticorps neutralisants chez tout cheval infecté par le virus AIE.

Cette spécificité est même encore plus étroite, car le virus P 337 a pour origine la souche Wyoming, or il s'en distingue complètement en

.../..

séro-neutralisation. Cette notion, ainsi que le paradoxe apparent de la présence simultanée du virus AIE et d'anticorps neutralisants homologues dans le sang de chaque cheval infecté ont amené KONO et coll. (1973) à étudier le pouvoir neutralisant du sérum d'un cheval infecté, prélevé à différents stades de l'évolution, sur le virus isolé du sang aux mêmes dates.

Ces Auteurs ont constaté que les anticorps présents dans le sang, neutralisaient le virus isolé à partir du même cheval, lors de crises antérieures, mais non pas le virus isolé le jour même ou ultérieurement.

Tout se passe donc comme si le virus subissait une modification de ses caractères antigéniques au cours de l'infection *in vivo* et échappait régulièrement aux anticorps neutralisants synthétisés par le cheval, par l'apparition de variants antigéniques. Les sérums neutralisants, obtenus par injection à des chevaux, du virus prélevé à différents stades de l'évolution d'un même cheval, reconnaissent surtout le virus correspondant ou celui du prélèvement voisin.

Ainsi, le virus AIE subirait, *in vivo*, une variation antigénique multidirectionnelle, à l'origine des crises successives. Selon KONO, deux mécanismes interviendraient dans l'immunité anti AIE : d'une part, une défense humorale à base d'anticorps neutralisants étroitement spécifiques de souche virale et même d'étape au cours de l'évolution d'une souche *in vivo* ; d'autre part, une défense cellulaire installée plus lentement, constatée chez les chevaux infectés depuis longtemps et expliquant la résistance à l'inoculation de souches hétérologues notée chez des chevaux infectés depuis plus de 300 jours. Ce deuxième mécanisme serait responsable de l'inhibition d'expression des variants antigéniques apparaissant plusieurs mois après l'infection. Cette inhibition peut être supprimée par l'administration d'immunosupresseurs qui déclenche une crise et permet l'isolement d'un mutant antigénique (KONO, 1973).

Deuxième partie :

MATERIEL ET METHODES

I - MATERIEL

A/ Animaux

Trois catégories d'équidés ont été utilisées : des chevaux, des poneys et des ânes. Ils ont servi à la production d'antigène, à l'étude de l'évolution de différents paramètres au cours de l'infection et à celle de l'immunité anti AIE :

- 24 équidés ont été infectés en vue de la production d'antigène :
  - 16 chevaux : Edelweiss, Naudary, Oubliée, Barbu, Letkiss, Ipso Facto, Baudouin, Fanny, Rock, Patriarche, Mélanose, Bijou, Mélanie, Bienvenue, Sanguine, Poussif,
  - 6 poneys : Poney I, Poney II, Poney VII, Poney VIII, Tom Pouce, Sy Bémol,
  - 2 ânes : Annie, Anatomie ;
- 4 poneys ont été hyperimmunisés avec les précipitogènes du virus AIE : Poney 9, Gélose, Géronimo, Bianco ;
- 17 équidés ont été infectés expérimentalement en vue de l'étude de l'évolution de divers paramètres (fièvre, précipitines, sidéroleucocytes, anémie, protéines sériques...) et de la résistance à des réinoculations ultérieures de virus AIE :
  - 2 chevaux : Pasteur, Solitaire,
  - 14 poneys : Poney 5, Noiraud, Têtu, Vril, Retzquilleur, Leticia, Poney 9, Gélose, Géronimo, Bianco, Eden, Sassy, Tinamite, Dresdémone,
  - 1 âne : Siamato ;
- 5 chevaux atteints d'AIE dans les conditions naturelles, ont été étudiés de la même façon que les équidés expérimentalement infectés : Sy, Boy de Retz, Uvéa, Le Fortuné, Arlette.

Au total, 46 équidés ont été utilisés pour cette étude, compte non tenu de certains animaux hébergés de façon transitoire au service des maladies contagieuses : Douro, mère de Rock ; Eclipse, mère de Ipso Facto ; Avril IV, Maschietta...

L'âge des animaux variait de quelques mois (poulains : Rock, Letkiss, Ipso Facto) à un âge très avancé (Patriarche : hors d'âge). Mis à part l'AIE, tous étaient en bonne santé apparente sauf Mélanose et Mélanie atteints de mélanose.

.../..

B/ Souches virales

La plupart des expériences ont été conduites à l'aide de la souche Wyoming fournie par le Dr. MOTT (NADL, Ames, Iowa) sous forme de sérum lyophilisé (1er septembre 1947) et de sérum frais de cheval (n° 47, prélevé le 15 novembre 1968), puis passée d'équidé à équidé.

Ont été également employées :

. la souche Wyoming adaptée à la culture cellulaire, fournie par le Dr. PEARSON (NADL, Ames, Iowa) (réf : ED 36 ; EIA 67) ;

. des souches françaises isolées à Alfort à partir de différents chevaux : Boy de Retz, Avril IV, Arlette, Maschietta...

Chaque échantillon de virus est désigné par le nom de la souche, le nom du cheval (notamment pour la souche Wyoming qui a subi de nombreux passages *in vivo*) et la date du prélèvement.

C/ Cultures cellulaires

La lignée cellulaire de derme de cheval (Equine Dermis : E.D.), chroniquement infectée par le virus AIE, a servi à :

- produire du virus pour l'étude des précipitogènes d'origine cellulaire,
- étudier la distribution des antigènes viraux dans les cellules à l'aide de la technique d'immunofluorescence,
- préparer des lames permettant la caractérisation d'anticorps anti AIE révélables par la technique d'immunofluorescence indirecte.

Différents lots de cellules ont été utilisés :

. Cellules E.D. chroniquement infectées par le virus AIE, fournies par PEARSON, réf : ED 36, EIA 67 du 5.9.74 et ED 23, EIA 111 du 6.1.75.

. Cellules E.D. normales (réf. Laboratoire Flow, NBL 6) ultérieurement infectées par le surnageant de la culture des précédentes.

Les cellules sont cultivées dans des flacons de 250 ml contenant 25 ml de milieu M.E.M. enrichi, additionné de 10 p. cent de sérum de veau foetal :

Milieu M.E.M. (Eurobio) concentré	100 ml
Eau bidistillée	900 ml
L Glutamine	10 ml
Pyruvate	10 ml
Tryptose phosphate	30 ml
Acides aminés	20 ml

.../..

Antibiotiques : pénicilline . . . . . 200.000 U.
streptomycine . . . . . 200 mg
Bicarbonate de sodium à 5,6 p. cent q.s; pour un pH de 7.

Lorsque le tapis cellulaire est complet, la trypsination est effectuée à l'aide d'une solution de trypsine versène à 1 p. mille. Après récupération du milieu de culture servant à la préparation de l'antigène, 2 ml de la solution de trypsine versène sont introduits dans le flacon et laissés pendant environ 10 secondes. 5 ml de la solution y sont ensuite déposés et laissés pendant environ 20 secondes. Le liquide est rejeté en partie, puis le flacon placé à l'étuve à 37° jusqu'à décollement complet du tapis. 10 ml de milieu contenant du sérum sont introduits dans le flacon pour séparer complètement les cellules, puis on ajoute 40 ml de milieu de culture et on répartit le liquide dans deux flacons ou dans des tubes de Leighton.

Une trypsination est effectuée en moyenne tous les 4 jours.

D/ Antigènes

Indépendamment des antigènes produits à Alfort, nous avons reçu et étudié des échantillons en provenance de différents laboratoires :

- Antigènes d'origine splénique envoyés par COGGINS (U.S.A.), BOULANGER (Canada), HART (U.S.A.), BOHM (R.F.A.), CELER (Tchécoslovaquie), CESAR LORA (Pérou), DE BOER (Hollande), LARS RYDEN (Suède), FEDIDA (France), PETROVIC (Yougoslavie), antigène d'origine splénique commercialisé par PITMANN MOORE (U.S.A.),
- Antigènes d'origine cellulaire envoyés par PEARSON (U.S.A.) et par NAKAJIMA (Japon).

E/ Sérums et gamma globulines

Différents types de sérums et de préparations de gamma globulines ont été utilisés :

- Sérums anti AIE

Ont été étudiés :

. des sérums de chevaux infectés d'AIE dans les conditions naturelles, et d'origine française ou étrangère,

.../..

. des sérums de chevaux infectés expérimentalement par le virus AIE, prélevés de façon régulière tous les 8 à 15 jours,
. des sérums de référence de laboratoires étrangers,
. des sérums de poulains issus de mère infectée par le virus AIE,
. du colostrum de jument infectée par le virus AIE,
. des sérums de poneys ayant reçu des injections des précipitogènes G et C du virus AIE selon le protocole suivant :

Les antigènes G et C utilisés pour l'hyperimmunisation des poneys sont préparés à partir de surnageant de rate, traité par le sulfate d'ammonium et provenant de chevaux infectés par la souche Wyoming. On fait ensuite réagir, en milieu gélosé l'antigène G ou l'antigène C avec un sérum anti AIE. Deux jours après le dépôt des réactifs, on soumet les boites à un lavage pendant 3 jours puis on prélève la gélose contenant la ligne de précipité. Les fragments de gélose sont émulsionnés, centrifugés et le surnageant est mélangé à de l'adjuvant de Freund.

Les poneys reçoivent par voie intradermique l'émulsion antigénique et par voie sous-cutanée le résidu gélifié contenant encore du précipité. Les injections d'antigène ont été faites :

- pour le poney 9 (anti G), avec de l'adjuvant de Freund au jour 0, et sans adjuvant aux jours 7, 14, 21, 48 et 80 (1 à 2 ml de solution antigénique) ;
- pour les poneys Géronimo et Gélose (anti G) avec adjuvant de Freund aux jours 0, 7, 14, 21 et 43 ;
- pour le poney Bianco (anti C), avec adjuvant de Freund aux jours 0, 57, 119 et 151, sans adjuvant aux jours 7, 14, 22 et 29.

- Préparation de gamma globulines antilymphocytes de cheval

Le sérum a été préparé par injection à deux moutons d'une suspension de thymocytes de cheval en eau physiologique tamponnée de pH 7,2.

Les deux premières injections comprennent 10^8 thymocytes associés à de l'adjuvant de Freund, administrés par voie intradermique. Les injections ultérieures sont réalisées par voie intramusculaire à la dose de 5.10^9 thymocytes. Des échantillons de sang sont prélevés après 7 à 13 injections.

720 ml de sérum sont traités par le sulfate d'ammonium à 33 p. cent pour extraire les gamma globulines (mélange de 720 ml de sérum, 720 ml

.../..

d'eau distillée et 720 ml de sulfate d'ammonium saturé, pH 7,4, agité à +4°C pendant une heure puis centrifugé une heure à 16.000 g. Le culot est repris dans de l'eau physiologique tamponnée et dialysé contre ce même tampon).

Les gamma globulines sont ensuite absorbées sur un polymère de foie et de sérum de cheval. 500 g de foie de cheval sont broyés dans du tampon phosphate 10 mM, pH 7,4 (Nacl 150 mM). Le précipité résultant de l'action du sulfate d'ammonium à une concentration de 2,8 M de sulfate sur 800 ml de sérum de cheval est ajouté au broyat après dialyse contre ce même tampon. 400 ml du mélange (83 mg de protéines par ml) sont polymérisés par de la glutaraldéhyde (10 g de glutaraldéhyde pour 100 g de protéines). Après séjour à +37°C pendant une nuit, le polymère est lavé 10 fois avec du tampon phosphate 100 mM, pH 7 puis deux fois pendant 15 minutes dans du tampon Hcl glycine 200 mM, pH 2,8. On neutralise ensuite avec 300 ml de K_2 HPO4 1M et on lave une fois dans de l'eau physiologique tamponnée.

Les gamma globulines sont absorbées 3 fois sur le polymère, pendant 1 heure à température du laboratoire et une nuit à +4°C. Entre chaque absorption, le polymère est régénéré par 5 lavages au tampon Hcl glycine 200 mM, pH 2,8. Après chaque absorption, l'activité anticorps des gamma globulines vis-à-vis d'un surnageant de broyat de foie et du sérum de cheval, est contrôlée.

Les gamma globulines sont ensuite absorbées sur hématies de cheval. Un volume de culot d'hématies lavées est suspendu dans deux volumes de gamma globulines et agité lentement pendant 1 heure à +4°C.

Après centrifugation, les gamma globulines sont récupérées et filtrées (filtrations clarifiantes sur filtres Seitz C7 et C10 puis filtration stérilisante sur filtre EK S_1).

Enfin, l'activité des gamma globulines sur les lymphocytes de cheval est déterminée par réaction de lymphocytotoxicité en présence de complément de lapin (SALMON et coll., 1973). Le titre est compris entre 1/160 et 1/320. Le titre du sérum avant purification et absorptions était compris entre 1/320 et 1/640.

- Sérum anti immunoglobulines de cheval (Institut Pasteur)

.../..

- Sérum de mouton antisérum total de cheval (ISCAKI), sérum anti IgT, sérum anti IgA (SANDOR), sérum anti colostrum de jument préparé à Alfort par immunisation de lapin à l'aide de colostrum de jument saine.

II - METHODES

A/ Infection des équidés en vue de la production des précipitines

Après vérification de l'absence de précipitines anti AIE dans leur sérum, les équidés utilisés pour la production des précipitogènes (16 chevaux, 6 poneys et 2 ânes) reçoivent par voie veineuse du sang et du sérum virulents en quantité variable (tableau VII). Pour certains équidés, la moitié de la dose a été injectée le premier jour et la seconde moitié le deuxième jour (Naudary, Sanguine, Poussif). La dexaméthasone a été employée pour les chevaux Sanguine et Poussif dans les conditions suivantes :

Sanguine : 15 mg par voie intramusculaire le premier jour de l'injection du virus.
30 mg par voie veineuse les 4 jours suivants.

Poussif : 30 mg le premier jour de l'inoculation de virus et les deux jours suivants.

La température des équidés est relevée deux fois par jour et la courbe thermique tracée. En fonction de cette dernière, les animaux sont sacrifiés à une date variant, en général, entre le 8ème et le 11ème jour après l'infection. Avant l'abattage et en même temps que l'anesthésique, 10 ml d'adrénaline au millième sont injectés par voie veineuse pour favoriser la contraction splénique. La saignée est effectuée de la façon la plus complète possible ; du sang est prélevé sur anticoagulant et sans anticoagulant en vue de la préparation de matériel destiné à l'inoculation d'autres équidés.

A l'autopsie, différents organes ou fragments d'organes sont prélevés (rate, foie, poumon, coeur, reins, ganglions lymphatiques, thymus...) ; ils sont ensuite soumis aux techniques d'extraction des précipitogènes.

.../..

B/ Préparation des extraits antigéniques

Des extraits antigéniques non purifiés ont été préparés à partir de rates de chevaux et de cultures infectés par le virus AIE.

1) A partir de la rate

Deux techniques ont été retenues, l'une faisant appel à une extraction par l'éther.

a) Extraction par cycles de congélation décongélation

La rate est découpée en petits morceaux, puis broyée à l'utra-turrax à +4°C. Le broyat de rate est réparti dans des flacons de 100 ml qui sont soumis à une dizaine de cycles de congélation décongélation, par passages successifs dans de l'alcool contenant de la glace carbonique et dans un récipient recevant de l'eau courante.

Le broyat de rate est alors centrifugé pendant 2 heures à 27.000 g à +4°C. Le surnageant est récupéré, dialysé contre du tampon phosphate 50 mM, pH 7,4 et constitue l'extrait brut contenant les précipitogènes AIE.

Le culot est repris dans un égal volume d'eau distillée, homogénéisé à +4°C à l'aide de l'ultra-turrax, soumis à 5 cycles de congélation décongélation, puis centrifugé comme précédemment. Le surnageant représente un second extrait contenant les précipitogène AIE.

En fonction de la quantité des précipitogènes présents initialement dans la rate, on peut effectuer une ou plusieurs extractions.

b) Extraction par l'éther

La rate est coupée en petits morceaux après pesée (soit X g le poids de la rate). On ajoute X ml de tampon phosphate 50 mM, pH 7,4 contenant 0,1 p. cent de tween 80, et on homogénéise à l'aide d'un ultra-turrax à +4°C, puis on ajoute 3X ml d'éther et on agite pendant 30 mn. La phase surnageante d'éther est éliminée par aspiration à l'aide d'une pipette, et on poursuit l'élimination de l'éther présent dans le mélange en dégazant sous vide et sous agitation ; pour éviter la congélation du liquide, on place la fiole à vide dans un récipiant recevant de l'eau courante.

Le mélange est centrifugé 15 minutes à 3.000 tours/minute : on obtient plusieurs phases. On récupère la phase aqueuse à l'aide d'une

.../..

pipette, on dégaze la phase aqueuse sous vide, et on met à dialyser dans un boyau de dialyse Nojax contre du tampon phosphate 50 mM, pH 7,4 (il ne faut pas congeler le surnageant avant de l'avoir dialysé car sinon, lors de décongélation on constate un précipité).

Sur le mélange pulpe-éther obtenu après la centrifugation, on peut faire une nouvelle extraction ; on ajoute à la pulpe un volume identique de tampon phosphate contenant 0,1 p. cent de tween 80 et on recommence l'extraction comme ci-dessus. On peut faire plusieurs extractions à la suite.

2) A partir de cultures cellulaires (cellules Equine Dermis)

On ajoute du polyéthylène glycol de poids moléculaire 6.000 (Serlabo) à raison de 8 grammes pour 100 ml de surnageant de culture cellulaire et on favorise sa dissolution par agitation à température du laboratoire.

Le liquide est ensuite placé à +4°C pendant 18 heures puis centrifugé pendant 30 minutes à 3.000 g. Le culot est repris dans du tampon borate pH 8,6 et on ajoute une même quantité d'éther que l'on laisse agir pendant 2 heures à +4°C sous agitation. Après élimination de la phase éthérée, la phase aqueuse constitue l'antigène.

C/ Immunodiffusion en gélose

Différentes techniques faisant appel à l'immunodiffusion en gélose ont été employées.

1) Immunodiffusion à partir de cupules

Dans des boites de Pétri de 9 cm de diamètre on dépose une première couche de gélose (Noble Agar Difco) sous forme de 7 ml d'un gel à 1,5 p. cent dans du tampon borate pH 8,6 (Na OH : 2 g ; $H_3 BO_3$: 9 g ; H_2O : 1.000 ml). Après prise en masse de ce premier gel, on ajoute 17 ml d'un second gel à 0,7 p. cent dans le même tampon.

Deux heures après environ, 7 puits d'un diamètre de 7 mm, distants les uns des autres de 3 mm sont creusés à l'aide d'un emporte pièce métallique spécial (réf. Apelab) dans la couche supérieure de gélose.

.../..

Les réactifs sont déposés avec une micropipette Eppendorf à raison de 70 microlitres par cupule. La disposition la plus fréquente des réactifs, notamment lors de titrage des précipitines, est le dépôt d'antigène dans la cupule centrale, de sérum positif de référence dans deux cupules diamètralement opposées et de sérums à étudier dans les autres cupules. Pour faciliter la lecture grâce à une observation de la symétrie de la ligne de précipité du système positif, on place parfois, d'un côté dela cupule contenant le sérum positif de référence, le sérum à étudier, et de l'autre côté un témoin négatif constitué par de l'eau physiologique.

Les boites de Pétri sont laissées à la température du laboratoire en atmosphère humide et la lecture est réalisée en général après 48 heures.

2) Immunodiffusion à partir de disques de papier

Les disques utilisés sont des disques de cellulose de 9 mm de diamètre (Schleicher et Schüll, Céra Labo). Plusieurs modalités techniques ont été employées successivement ou simultanément :

- une technique sur grande plaque de verre de 17,5 cm sur 13 cm, dont la surface disponible était limitée par des bandes de caoutchouc de 15,5 cm sur 2 cm ou de 10,5 cm sur 2 cm, fixées sur la plaque par des élastiques. 8 ml de gélose à 0,5 p. cent dans du tampon phosphate pH 7,4 ou du tampon borate pH 8,6 étaient déposés par plaque et plusieurs groupes de disques étaient disposés après prise en masse du gel,

- une technique en petites boites étanches de 5 cm de diamètre (Block),

- une technique sur lames pour examen au microscope, de 7,6 cm sur 2,5 cm.

Pour ces deux dernières techniques, on dépose 1,3 ml de milieu gélosé à 0,5 p. cent sur la lame ou dans la boite placée sur une surface parfaitement horizontale.

Les réactifs sont déposés sur les disques à l'aide de micropipettes Eppendorf à raison de 50 microlitres par disque. Après prise en masse de la gélose, les disques sont appliqués à la surface du milieu à 3 mm de distance les uns des autres.

.../..

Pour la mise en évidence d'un précipitogène ou des anticorps correspondants dans un échantillon, on dépose celui-ci sur un disque placé près d'un système témoin positif antigène-anticorps, tandis que de l'autre côté, de façon symétrique, on place un disque qui recevra un échantillon témoin négatif.

On procède à la lecture après un temps variable de séjour en atmosphère humide à température du laboratoire.

3) Immunodiffusion radiale

Elle est réalisée dans des boites étanches de 5 cm de diamètre (Block). On prépare un milieu contenant 0,7 p. cent de gélose (Noble Agar Difco) et 1 p. mille d'azide de sodium dans du tampon borate de pH 8,6.

Après fusion, le milieu gélifié est ramené à +45°C pour l'addition du sérum contenant les anticorps. Les concentrations de sérum anti G et anti C à ajouter au milieu gélifié ont été déterminées après étude de plusieurs dilutions.

5 ml de milieu gélifié contenant un sérum anti sont placés par boite. Après solidification du milieu, on creuse de cupules de 7 mm de diamètre dans lesquelles on dépose 70 microlitres d'antigène à étudier.

Les boites sont ultérieurement observées quotidiennement ; les lignes de précipité apparaissent entre 24 et 96 heures ; le diamètre de chaque cercle est mesuré puis on calcule la surface du cercle.

4) Technique de LAURELL

On prépare un milieu gélifié contenant 1 p. cent de gélose et 1 p. mille d'azide de sodium dans du tampon borate pH 8,6 dilué au demi dans de l'eau distillée.

Après fusion du gel et refroidissement vers +45°C, on ajoute un sérum anti, de nature et à dose variable selon l'expérience.

3 ml de milieu gélifié additionné de sérum sont déposés sur des lames de 7,5 cm sur 2,5 cm, préalablement "glacées" à l'aide de gélose à 2 p. cent dans de l'eau distillée.

.../..

Après solidification du gel, une cupule de dimension variable selon l'expérience est creusée dans la gélose et l' on y dépose la solution antigène. On applique aux bornes de chaque lame 25 à 30 volts. Le courant électrique est maintenu pendant un temps variable avec un maximum de 3 heures.

5) Immunoélectrophorèse

Les lames de 7,5 cm sur 2,5 cm sont glacées à l'aide de gélose à 2 p. cent dans de l'eau distillée. D'autres lames (10,5 cm sur 4,5 et 12 cm sur 9) ont également été utilisées.

On prépare un milieu gélifié contenant de la gélose (Noble Agar Difco) ou de l'agarose (Industrie Biologique Française) à 1 p. cent dans un tampon dilué au demi dans de l'eau distillée et contenant 1 p. mille d'azide de sodium.

Tampon véronal 0,05 M, pH 8,2

47,6 g de diéthylmalonylurée sodée

69 ml d'Hcl normal

On complète à 4.300 ml avec de l'eau distillée et on ajoute 1p. mille d'azide de sodium.

Tampon borate pH 8,6 (déjà évoqué).

3 ml de milieu gélifié sont coulés par lame de 7,5 cm sur 2,5 cm. Après solidification, les cupules sont creusées et les gouttières dessinées.

Les bacs de l'appareil à électrophorèse (Apelab ST 3 C) reçoivent 450 ml de tampon non dilué. Les lames placées sur le portoir sont reliées au tampon des cuves à l'aide d'un pont de papier Whatman n° 1. On applique un courant de 25 à 30 volts aux bornes des lames de 7,5 cm pendant quelques minutes avant de déposer des réactifs à faire migrer. La migration se poursuit à +4°C pendant un temps variable selon l'expérience.

A la fin du passage du courant, les gouttières sont creusées et reçoivent les sérums anti.

.../..

D/ Isolement, purification et étude des précipitogènes

1) Précipitation des précipitogènes par le sulfate d'ammonium

La solution antigénique brute résultant de l'extraction de la rate par les cycles de congélation et décongélation ou par l'éther, dialysée contre du tampon phosphate 50 mM, pH 7,4 et amenée à la concentration de 85 mg/ml est soumise à l'action du sulfate d'ammonium à pH 7,4 et à +4°C.

Initialement, des précipitations fractionnées ont été faites à partir d'échantillons pour préciser les concentrations de sulfate d'ammonium entrainant la précipitation des antigènes AIE :

0 - 20 p. cent	20 - 100 p. cent
0 - 40 p. cent	40 - 100 p. cent
0 - 60 p. cent	60 - 100 p. cent
0 - 80 p. cent	80 - 100 p. cent

Ensuite, les concentrations en sulfate d'ammonium ont été étudiées de 3 p. cent en 3 p. cent à partir de 22 p. cent jusqu'à 61 p. cent.

Compte tenu des résultats, la séparation des précipitogènes G et C a été conduite en récupérant 4 fractions :

0 - 22 p. cent ; 22 - 40 p. cent ; 40 - 60 p. cent ; 60 - 100 p.ce

Pour chaque zone, on agite pendant 1 h à +4°C la solution antigénique portée à la concentration voulue de sulfate d'ammonium, puis on centrifuge pendant 1 heure à 17.000 g. Le surnageant est conservé à +4°C avant d'être soumis à l'action de la concentration suivante de sulfate d'ammonium.

Le culot est repris dans du tampon phosphate 50 mM, pH 7,4 et soumis à une dialyse contre du tampon phosphate 50 mM, pH 7,4. Après dialyse, les fractions sont concentrées sur membrane Diaflo PM10.

2) Chromatographie des précipitogènes sur colonne échangeuse d'ions

La chromatographie est réalisée sur diéthylaminoéthyl cellulose.

MATERIEL

. D E A E cellulose Whatman type 52.

. Tampons phosphate : 20 mM, pH 7,9 ; 35 mM, pH 7,9 ; 50 mM, pH 7,9 ; 100 mM, Nacl 400 mM, pH 7,9 ; 100 mM, Nacl I M, pH 7,9.

.../..

- G et C préparés par précipitation au sulfate d'ammonium et dialysés contre le tampon ayant servi à équilibrer la colonne (20 mM, pH 7,9 pour G, 35 mM, pH 7,9 pour C).
- Colonne Whatman de 30 cm de hauteur et 5 cm de diamètre.
- Pompe péristaltique (Büchler), cryostat (Haake KT 33) et D.O graphe (Seibe) réglé sur la bande d'absorption de 280 nm.

TECHNIQUE

Le gel est préparé, équilibré à pH 7,9, lavé 3 fois dans le tampon de début d'élution (cf ci-dessus) puis coulé dans la colonne et tassé. La pompe péristaltique est réglée à une vitesse de 360-380 ml/heure et l'on fait passer le tampon d'équilibrage pendant une heure avant de déposer le précipitogène (400 mg). La densité optique de l'éluat à 280 nm est enregistrée.

Dès que le premier pic est sorti, on commence la réalisation d'un gradient linéaire tampon phosphate 50 mM, pH 7,9 - tampon phosphate 100 mM, Nacl 400 mM, pH 7,9. Lorsque plus aucun pic ne sort, on fait passer le tampon phosphate 100 mM, Nacl I M, pH 7,9 pour laver la cellulose.

L'éluat est recueilli dans un collecteur de fractions à raison de 8 ml par tube. Les fractions correspondant à chaque pic sont concentrées sur membrane Diaflo PM 10 puis la présence du précipitogène est recherchée par immunodiffusion en gélose.

3) Gel filtration

Ont été utilisés : du Séphadex G 75 (Jarre et Jacquin) et de l'ACA_{54} (LKB).

a) Sur Séphadex G 75

Le gel de Séphadex G 75 est préparé en eau distillée, équilibré avec du tampon phosphate 50 mM, pH 7,9 ou 100 mM, pH 7,9, puis coulé dans une colonne Whatman de 90 ou 60 cm de hauteur et 2,5 cm de diamètre.

Après repos du gel dans la colonne pendant 24 heures et percolation de tampon à raison de 45 ml par heure pendant 24 heures, l'adaptateur est placé et, au bout de 24 heures, le dépôt de 0,5 ml de solution antigénique (10 mg de protéines) effectué. Le liquide d'élution est recueilli par fraction de 3 ml, après lecture et enregistrement de la densité optique à 280 nm.

Les fractions sont concentrées sur membrane Diaflo PM 10, puis étudiées en immunodiffusion en gélose.

.../..

b) Sur ACA 54

L'ACA 54 comprend 5 p. cent d'acrylamide et 4 p. cent d'agarose. Le gel est coulé dans une colonne de 100 cm de hauteur sur 2,6 cm de diamètre, puis pendant 2 jours on fait passer dans la colonne 40 ml par heure de tampon Hcl 500 mM, Nacl 500 mM, pH 7,4.

Un premier dépôt est effectué à l'aide de marqueurs dilués dans le tampon : 5 mg de thyroglobuline (P.M. 660.000), 5 mg de sérumalbumine bovine (P.M. 68.000), 5 mg d'ovalbumine (P.M. 45.000), 5 mg de peroxydase (P.M. 40.000), 5 mg d'alphachymotrypsinogène (P.M. 25.000), 5 mg d'alpha-chymotrypsine (P.M. 22.500), 5 mg de myoglobine (P.M. 17.800), 5 mg de lysozyme (P.M. 14.400) et 5 mg de Rnase (P.M. 13.500) pour déterminer le volume d'élution de chacune de ces substances. L'éluat est recueilli après enregistrement de la densité optique à 280 nm.

Le précipitogène est ensuite déposé. Les fractions recueillies sont concentrées sur membrane Diaflo PM 10 et étudiées en immunodiffusion en gélose.

4) Ultracentrifugation

a) Ultracentrifugation en gradient de saccharose

Pour déterminer la valeur des coefficients de sédimentation des antigènes G et C, nous avons utilisé la centrifugation de zone selon la méthode de MARTIN et AMES (1961) appliquée au rotor SW 65 (FRITSCH, 1973).

A l'aide d'un appareil Isco, on prépare dans chaque tube un gradient de 4,6 ml à partir de solutions de saccharose à 5 p. cent et à 20 p. cent dans du tampon phosphate 50 mM, pH 7,4 et on dépose à la surface 0,2 ml de précipitogène à étudier.

Les tubes sont ensuite centrifugés pendant 20 heures à 64.000 tours par minute (ultracentrifugeuse Beckman Spinco L II B, rotor SW 65).

Le contenu des tubes est récupéré par voie ascendante sous forme de fractions de 0,2 ml (collecteur de gradient Isco). Pour chaque fraction, l'indice de réfraction est déterminé à l'aide d'un réfractomètre puis l'activité antigénique est recherchée par immunodiffusion en gélose.

Le coefficient de sédimentation S_{20w} est calculé à partir de l'équation ci-dessous, en remplaçant α par la valeur déterminée par FRITSCH (1973) pour le rotor SW 65 employé dans les mêmes conditions :

$$r - rm = \alpha \, S_{20w} \, \omega^2 \, t$$

.../..

où "r - rm" représente la distance de migration de la particule, "ω" la vitesse angulaire et "t" le temps de centrifugation.

La position du lysozyme utilisé comme marqueur de vélocité (S_{20w} = 1,9) repérée par absorption à 280 nm, confirme les données obtenues par le calcul.

b) Ultracentrifugation en gradient de chlorure de césium

Un gradient de densité de chlorure de césium est obtenu par dissolution de 1,543 g de ClCs dans une solution contenant 0,2 ou 0,4 ml d'antigène purifié dilué dans du tampon phosphate 50 mM, pH 7,4 et centrifugation à 38.000 tours par minute (+4°C) pendant 65 heures (rotor SW 65). Le gradient est collecté en une trentaine de fractions qui sont étudiées comme précédemment.

5) Focalisation isoélectrique

Le point isoélectrique des antigènes est déterminé par migration électrophorétique au sein d'un gradient de pH (3 à 10), réalisé dans un appareil fabriqué à Thiverval Grignon (Laude). On y dépose successivement :

- 3 ml d'une solution de H_2 SO_4 à 1 p. cent
- 1 ml d'une solution de sucrose à 60 p. cent
- 10 ml de gradient linéaire composé à partir de solution lourde (ampholines LKB 3-10 à 1 p. cent et sucrose à 40 p. cent) et de solution légère (ampholines à 1 p. cent et sucrose à 5 p. cent) contenant les précipitogènes
- 0,5 ml de solution de sucrose à 5 p. cent
- 2 ml d'éthylène diamine à 2,5 p. mille.

On applique à la colonne une différence de potentiel de 400 volts pendant 36 heures.

Le contenu de la colonne est ensuite récupéré par fraction de 0,5 ml (collecteur de gradient Isco). Le pH de chaque fraction est immédiatement mesuré puis on détermine l'activité de chaque fraction en immunodiffusion en gélose.

6) Action de la chaleur sur les précipitogènes

Un extrait antigénique contenant les précipitogènes G et C a été distribué à raison de 0,5 ml dans 4 tubes à hémolyse. Un tube témoin est laissé à

.../..

température du laboratoire. Les trois autres tubes sont placés dans un bain-marie à +50°C et sont retirés respectivement au bout de 15, 30 et 60 minutes. La présence des précipitogènes est ensuite recherchée par immunodiffusion en gélose.

7) Action du pH sur les précipitogènes

Un extrait antigénique contenant les précipitogènes G et C est réparti à raison de 1 ml dans des tubes à hémolyse. On ajoute goutte à goutte de l'acide chlorhydrique 2N en vérifiant le pH après chaque addition à l'aide de papier pH. L'antigène est laissé au pH voulu pendant 15 minutes puis le milieu est ramené au pH d'origine (pH 7) à l'aide d'ammoniaque. Pour les pH basiques, le protocole inverse est appliqué. La présence des précipitogènes est ensuite déterminée par immunodiffusion en gélose.

E/ Etude des anticorps anti AIE

1) Chromatographie des sérums sur DEAE cellulose

Les sérums sont dialysés pendant 48 heures contre du tampon PO_4KH_2-PO_4K_2H 0,01 M, pH 7,85 (555 ohms-cm) et le tampon est changé 6 fois. Ils sont ensuite centrifugés à 12.000 g pendant 15 minutes et le culot est repris dans de l'eau physiologique.

La DEAE cellulose est placée dans une colonne de 4 sur 20 cm ou de 5 sur 30 cm. On dépose de 35 à 42 ml de sérum sur la colonne.

L'élution se fait à l'aide de 3 tampons :

- tampon PO_4KH_2 - PO_4K_2H 0,01 M, pH 7,85 qui entraine la sortie des fractions appelées I et I bis. Lorsque la densité optique est revenue aux environs de 0,15, on applique le tampon suivant :

- tampon PO_4KH_2 - PO_4K_2H 0,01 M, Nacl 0,04 M, pH 7,85. On obtient la fraction appelée 2 et lorsque la densité optique a de nouveau atteint 0,15 on emploie le troisième tampon :

- tampon PO_4KH_2 - PO_4K_2H 0,01 M, Nacl 0,3 M, pH 7,85.

L'éluat est recueilli à raison de 8 ml par tube et la densité optique du contenu de chaque tube est mesurée à 280 nm. Le liquide des tubes de chaque fraction est ensuite mélangé et on mesure le volume et la densité

.../..

optique des fractions. La fraction 3 est dialysée contre de l'eau distillée pendant une heure.

La concentration des fractions est obtenue par pervaporation ou par passage sur membrane Diaflo PM 30. Après concentration, les fractions sont dialysées contre du tampon PO_4KH_2 - PO_4K_2H 0,15 M, pH 7 et centrifugées pendant 15 minutes à 12.000 g. Les volumes et la densité optique à 280 nm sont de nouveau mesurés pour chaque fraction.

Le culot de dialyse initiale du sérum, repris dans 5 ml d'eau physiologique ainsi que les diverses fractions sont ensuite soumis à un titrage des précipitines anti G et anti C par immunodiffusion en gélose. La composition en immunoglobulines de chaque fraction est appréciée par immunoélectrophorèse vis-à-vis de divers sérums anti sérum de cheval.

2) Gelfiltration

a) Sur Sephadex G 200

Le gel est gonflé, lavé dans le tampon (tampon PO_4KH_2 - PO_4K_2H 0,1 M, Nacl 0,15 M, Na N_3 0,02 M, pH 7) coulé dans la colonne (Pharmacia, K 50/100) et tassé par percolation descendante.

Après centrifugation pendant une heure à 100.000 g, destinée à la séparation des lipides et de particules en suspension, le colostrum dilué au demi est déposé sur la colonne (30 à 40 ml). Le débit de courant ascendant est réglé à 40 ml par heure. Les fractions sont récupérées à raison de 13 ml par tube (collecteur de fractions L K B), la densité optique à 280 nm de chaque tube est lue au spectrophotomètre (Beckman), puis les fractions sont rassemblées en fonction des pics. Les différents mélanges sont concentrés par pervaporation, dialysés contre du tampon phosphate 0,15 M, pH 7 et centrifugés. On calcule alors la proportion des protéines correspondant à chaque pic et on détermine leur activité précipitante en immunodiffusion en gélose.

b) Sur Sepharose 4 B

On dépose sur la colonne de Sepharose 4 B le premier pic obtenu par gelfiltration du colostrum sur Sephadex G 200. Le débit du tampon (tampon phosphate 0,01 M, pH 7) est réglé à 45 ml par heure. La suite des opérations est conduite comme ci-dessus.

.../..

3) Immunoélectrophorèse

On utilise de l'agar à 1,5 p. cent, dans du tampon véronal de pH 8,2 coulé sur des plaques de 12 cm sur 9 cm. Le courant est appliqué (45 volts par plaque, soit 5 volts/cm) pendant 90 minutes. Les protéines sériques de cheval sont révélées par des sérums de mouton anti cheval (sérum unique ou mélange de sérums) ou par des sérums monospécifiques, anti IgT en particulier. Après 24 heures, les plaques sont lavées pendant 2 à 3 jours, puis les puits et gouttières remplis d'agar à 1,5 p. cent. On dépose du papier Whatman sur le gel et les plaques sont séchées pendant 5 heures à +56°C. Les plaques sont colorées à l'amido-schwarz, décolorées, séchées et photographiées. La gélose est ensuite décollée de la plaque de verre, placée entre deux feuilles de triacétate substraté 2 faces, et conservée.

F/ Electrophorèse des sérums sur acétate de cellulose

Les bandes de Cellogel sont immergées pendant un temps allant de 15 minutes à une nuit, dans du tampon véronal de pH 9,2 (8,24 g de véronal sodique pour 1.000 ml d'eau), puis sont placées sur les portoirs adéquats (matériel Sébia) et les sérums sont déposés à l'aide de l'applicateur Sébia pour électrophorèse standard à raison de 2 microlitres.

Une tension de 200 volts est appliquée pendant 75 minutes.

Les bandes sont ensuite colorées par immersion pendant 10 minutes dans une solution comprenant 0,5 g de rouge ponceau pour 100 ml d'acide trichloracétique à 5 p. cent. La différenciation est réalisée par trois bains d'acide acétique à 5 p. cent. Les bandes sont alors déshydratées par séjour d'une minute dans du méthanol pur, puis rendues transparentes par immersion pendant 2 minutes 30 secondes dans une solution composée de 75 ml de méthanol, 20 ml d'acide acétique et 5 ml de diacétonalcool. Elles sont enfin séchées sur une plaque de verre, à température du laboratoire.

Les électrophorégrammes sont lus sur un photomètre intégrateur Elv 181 et les pourcentages de chaque fraction sont évalués graphiquement sur la courbe d'intégration.

G/ Immunofluorescence indirecte

Les cellules E.D. chroniquement infectées par le virus AIE sont cultivées en tube de Leighton. Après 48 heures de culture, les lamelles

.../..

sont lavées à l'eau physiologique puis soumises à l'action de l'acétone glacée pendant 20 minutes. Chaque lamelle est ensuite fixée, par sa face libre, sur une lame, à l'aide de baume du Canada. Chaque lame portant une lamelle est séchée par séjour de 20 minutes à +37°C, puis conservée à -20°C.

Lors de la coloration, les lames sont placées à +37°C pendant quelques minutes, puis on dépose 0,05 ml de sérum à étudier, dilué au 1/5ème. Après séjour en atmosphère humide à +37°C pendant 30 minutes, les lames sont lavées dans deux bains d'eau physiologique tamponnée, à raison de 10 minutes par bain.

On dépose ensuite sur chaque lamelle 0,05 ml de sérum fluorescent anti globulines de cheval (Institut Pasteur) dilué à 1/60. Après une nouvelle incubation en atmosphère humide, à +37°C pendant 30 minutes, les lames sont lavées à l'eau physiologique tamponnée de la même manière que précédemment. On place une goutte de glycérine tamponnée sur la lamelle et celle-ci est recouverte par une autre lamelle. Les lames sont observées au microscope (Leitz, lampe HBO 200 w, filtre BG 12) puis photographiées (Orthomat Leitz).

H/ Recherche des sidéroleucocytes

Le prélèvement est constitué par 40 ml de sang prélevé sur anticoagulant. On laisse sédimenter les globules rouges pendant une demi-heure environ en plaçant le tube à 45° par rapport à l'horizontale.

Le plasma est prélevé, centrifugé dans un tube conique pendant 3 minutes à 1.500 tours par minute, puis le surnageant décanté. Le culot de globules blancs est homogénéisé dans le reste de plasma puis sert à préparer les frottis. Ceux-ci sont séchés puis colorés pendant 10 minutes avec une solution fraichement préparée d'un mélange, à parties égales, d'acide chlorhydrique à 10 p. cent et de ferrocyanure de potassium à 10 p. cent. Après lavage pendant 5 à 6 minutes par de l'eau distillée, on recolore par une solution à 1 p. cent de safranine pendant 30 secondes à une minute.

On examine ensuite la lame afin de déterminer le nombre de sidéroleucocytes pour 100.000 leucocytes.

I/ Dosage des protéines

Il a été réalisé par la technique de LOWRY et coll. (1951).

.../..

Troisième partie :

RESULTATS EXPERIMENTAUX

I - ETUDE DES PRECIPITOGENES AIE

Nous envisagerons successivement :

l'obtention des préparations antigéniques brutes AIE,

l'isolement et la purification des précipitogènes G et C,

les propriétés des précipitogènes G et C.

Cependant, auparavant, nous indiquerons comment nous avons constaté la présence d'un second précipitogène spécifique de l'AIE à côté du premier décrit par COGGINS et NORCROSS (1970) et par NAKAJIMA et coll. (1971).

Initialement, nous utilisions uniquement l'immunodiffusion en gélose avec dépôt des réactifs dans des cupules. Le désir d'étudier le rôle de paramètres, comme la distance des sources de réactifs et leur disposition, dans la formation optimale des précipités, nous a amené à chercher un mode de dépôt des réactifs indépendant d'un schéma stéréotypé conditionné par l'emporte-pièce disponible. De même, le souhait de rendre plus sensible la technique de révélation de l'antigène ou de l'anticorps anti AIE nous a conduit à diminuer l'épaisseur de la couche de milieu gélifie. Cependant, ce faisant, la hauteur des cupules diminuait parallèlement et la quantité de réactif que l'on pouvait déposer dans chaque cupule devenait insuffisante.

Par suite, pour diminuer l'épaisseur de la couche de gélose, rendre aisément modifiables la distance et la disposition des sources de réactifs et conserver la possibilité de déposer une quantité importante de réactifs, nous avons choisi des disques de papier de 9 mm de diamètre à haut pouvoir absorbant.

L'emploi d'une mince couche de milieu gélifié (moins d'un millimètre) et le dépôt de 50 microlitres de réactif par disque nous ont permis de déterminer les conditions optimales de disposition des sources de réactifs.

Cependant, nous nous apercevions rapidement qu au lieu d'une seule ligne de précipité, comme on l'observait dans la gélose des boites de Pétri creusée de cupules, deux ou parfois un plus grand nombre de lignes apparaissaient. Le nombre de lignes était d'ailleurs parfois variable pour des dépôts identiques. Des exemples de tels résultats sont représentés par les figures a, b et c planche I.

La répétition des expériences dans des conditions identiques, notamment de température, l'abandon de la technique sur grandes plaques,

.../..

PLANCHE I

Figure a : Immunodiffusion en gélose. 1 : Antigènes G et C (Poney II) ; 2 : Sérum positif de référence Alfort ; 3 à 6 : Dilutions du sérum positif de référence Alfort (7/8 ; 6/8 ; 5/8 ; 4/8). On constate des variations d'aspect de la ligne de précipité G -anti G.

Figure b : Immunodiffusion en gélose. 1 : Antigènes G et C d'origine splénique (Poney II) ; 2 : Sérum positif de référence Alfort. On assiste à des dédoublements des lignes de précipité G -anti G et C -anti C.

Figure c : Immunodiffusion en gélose. 1 : Antigènes G et C (Poney II) ; 2 : Sérum positif de référence Alfort. On constate des dédoublements des lignes de précipité G -anti G et C -anti C.

Figure d : Immunodiffusion en gélose. 1 : Antigènes G et C (origine splénique) ; 2 : Sérum positif de référence Alfort ; 3 : Sérum positif de référence Alfort, dilué au demi. Lignes de précipité G -anti G (plus près de 1) et C -anti C (près de 2).

Figure e : Immunodiffusion en gélose. 1 : Antigènes G et C (Fanny) ; 2 : Sérum positif de référence Alfort ; 3 : Sérum de cheval infecté par le virus AIE. Lignes de précipité G -anti G et C -anti C formées par des sérums différents.

Figure f : Immunodiffusion en gélose. 1 : Antigènes G et C d'origine splénique (Fanny) ; 2 : Antigènes G et C d'origine splénique (Barbu) ; 3 : Sérum positif de référence Alfort. Lignes de précipité G -anti G et C -anti C formées à partir d'extraits spléniques différents.

Figure g : Immunodiffusion en gélose. 1 à 5 : Extraits antigéniques préparés à partir de diverses rates de chevaux ; 6 : Sérum positif de référence Alfort. Formation des deux lignes de précipité à partir de divers extraits spléniques.

Figure h : Immunodiffusion en gélose. 1 : Antigènes G et C (Fanny) ; 2 : Sérum positif de référence Alfort ; 3 : Sérum positif de référence Alfort dilué 2 fois ; 4 : Extrait splénique du poney Leticia. La rate de Leticia renferme à la fois des précipitines anti G et du précipitogène C.

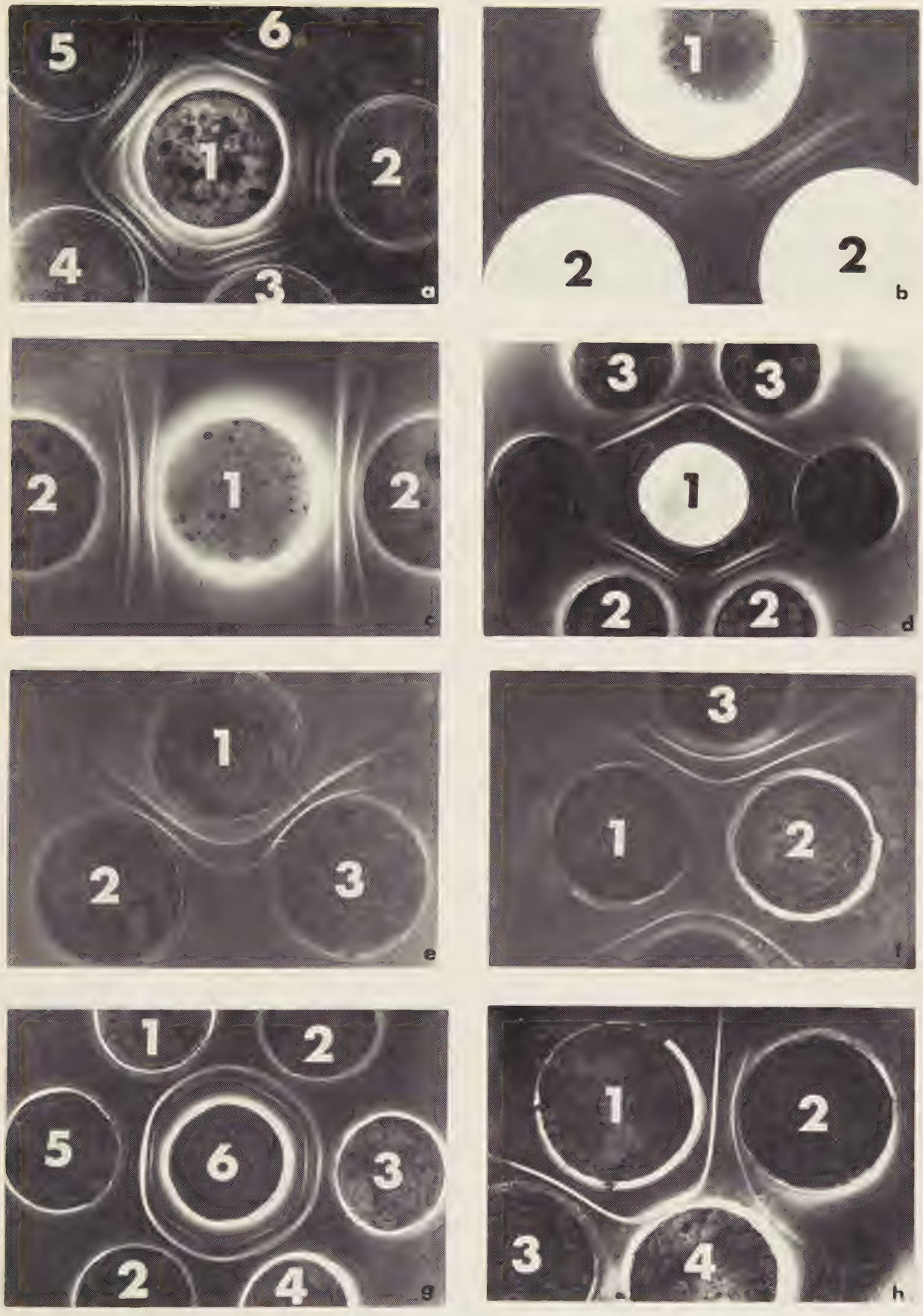


PLANCHE I

génératrice de phénomènes d'évaporation sur les bords, nous amenaient sinon à faire disparaitre complètement les artefacts, du moins à la certitude de l'existence de deux lignes de précipité correspondant à deux précipitogènes (figures d à g, planche I).

Le précipitogène générateur de la ligne la plus proche de la source d'antigène a été nommé G (antigène) ; l'autre, entrant dans la formation de la ligne de précipité la plus proche de la source d'anticorps a été appelé C (anticorps).

La démonstration de l'existence de ces deux précipitogènes, de leur indépendance, de leur spécificité, a été apportée grâce à des techniques d'isolement et de purification à partir de la solution antigénique brute.

A/ Obtention des préparations antigéniques brutes AIE

Les précipitogènes G et C ont été produits à partir d'organes d'équidés infectés ou de cultures cellulaires.

1) Organes d'équidés infectés

Les modalités de l'infection des équidés, leur réponse thermique et leur production des précipitogènes G et C sont regroupées dans le tableau VII. Des exemples d'évolution de la température des chevaux après l'inoculation sont fournis par les figures 1 à 16.

a) Présence des précipitogènes G et C dans la rate

Sur les 25 rates utilisées, 23 contenaient les précipitogènes G et C au moment de l'abattage ou de la mort, une uniquement le précipitogène G et une autre aucun précipitogène.

En général, l'antigène G se trouve en quantité plus importante que l'antigène C ; il en est ainsi chez 22 équidés sur 23. En revanche, l'extrait splénique préparé à partir du Poney VIII contenait plus d'antigène C que d'antigène G, ce dernier étant décelable seulement à l'état de traces.

Par ailleurs, dans l'extrait splénique du poney Leticia on notait la présence simultanée d'anticorps anti G et d'antigène C (figure h, planche I).

Ce poney avait été initialement infecté par injection d'une petite quantité (0,01 ml) de sérum contenant une souche française de virus AIE (souche Alfort Arlette) et n'avait présenté aucune réaction fébrile nette au cours des 193 jours suivants. La preuve de son infection était cependant

.../..

TABLEAU VII : Obtention des précipitogènes du virus AIE à partir d'organes d'équidés.

Nom de l'équidé et date de la mort	Inoculation intra-veineuse	- Date d'apparition de la fièvre - Maximum de la fièvre - Durée de la fièvre	Date d'abattage	Présence de G et C	
				dans la rate	dans les autres organes
Edelweiss (poulain)(9.2.71)	50 ml de sérum souche Wyoming	- 9è jour - 41 au 9è jour - 2 jours	11è jour	G et C	Non recherché
Naudary (cheval)(1.4.71)	300 ml de sang } Edelweiss 150 ml de sérum } à 24 h d'intervalle	- 7è jour - 40,3 au 8è jour - 3 jours	9è jour	G et C	Poumon et ganglions : G et C Foie: G ; Pancréas: 0
Poney I (16.6.71)	40 ml de sang } Naudary 70 ml de sérum }	- 4è jour - 40,4 au 4è jour - 5 jours	9è jour	G et C	Non recherché
Poney II (7.7.71)	30 ml de sang } Poney I 100 ml de sérum }	- 4è jour - 40,5 aux 5è et 6è jours - 5 jours à plus de 40°	9è jour	G et C	Non recherché
Poney VII (25.10.71)	200 ml de sang 200 ml de sérum	- 4è jour - 41,2 le 4è jour - 5 jours	9è jour	G et C	Poumon : G
Poney VIII (29.10.71)	200 ml de sang 200 ml de sérum	- 7è jour - 40,1 le 10è jour - 4 jours	11è jour	G:traces C:prédominant	Poumon : 0
Tom Pouce (poney)(5.1.72)	50 ml de sérum souche française	- 2è jour - 14è jour : 39,3	mort le 27è jour	G et C	Non recherché
Oubliée (jument)(26.2.72)	150 ml de sang Poney VII 120 ml de sérum Poney II	- 4è jour - 39,6 le 8è jour - 5 jours	9è jour	G et C	Poumon : G et C
Barbu (cheval)(4.7.72)	100 ml de sang Poney VII 300 ml de sérum Poney I	- 2è jour - 40,6 le 6è jour - 6 jours	8è jour	G et C	Poumon : G et C Foie : 0
Letkiss (pouliche)(17.9.72)	130 ml de sang } Barbu 130 ml de sérum }	- 2è jour - 41,6 le 5è jour - 4 jours	mort le 5è jour	G et C	Poumon, rein, foie, ganglion et thymus : G et C ; Coeur : G
Ipso Facto (poulain)(22.9.72)	130 ml de sang } Barbu 130 ml de sérum }	- 6è jour - 39,5 le 7è jour	10è jour	G et C	Poumon et thymus : 0
Baudouin (cheval)(31.10.72)	175 ml de sang } Barbu 175 ml de sérum }	- 5è jour - 40 le 5è jour - 3 jours	8è jour	G et C	Poumon : G et C Foie : G Rein : 0
Fanny (jument)(10.11.72)	250 ml de sang Baudouin	- 5è jour - 41 le 8è jour - 3 jours	10è jour	G et C	Poumon et ganglions : G et C Foie : G ; Rein : 0

Rock (poulain)(12.12.72)	250 ml d'un mélange de sang Baudouin et sérum Fanny	- 5è jour - 40 au 6è jour - 3 jours	8è jour	G et C	Poumon, ganglions et Foie : G et C Rein, pancréas, coeur, thymus : 0
Patriarche (cheval)(28.12.72)	230 ml de sang } Rock 125 ml de sérum }	- 4è jour - 39,5 le 4è jour - 3 jours	10è jour	G et C	Poumon : G et C Foie et rein : G
Mélanose (cheval)(31.8.73)	220 ml d'un mélange de sang Rock et sérum Fanny	- 3è jour - 39,5 le 3è jour - 2 jours	11è jour	G et C	Poumon : G et C Foie : G Ganglions :traces G
Bijou (cheval)(20.9.73)	250 ml d'un mélange de sérum Fanny et sérum Baudouin	- 7è jour - 40,5 le 8è jour - 3 jours	10è jour	G et C	Poumon et Foie: G et C Ganglions : G
Mélanie (jument)(13.10.73)	220 ml de sang Bijou 150 ml de sérum Mélanose	- 1er jour - 40,5 le 5è jour - 7jours	8è jour	G et C	Poumon : G et C Foie et rein : G Pancréas : 0
Leticia (poney)(6.11.73)	0,01 ml de sérum souche française le 5.4.73 0,5 ml de sérum Mélanose	- 11è jour après l'injection de sérum de mélanose - 41,3 le 22è jour - 10 jours	Mort le 22è jour après la seconde inoculation	C anti-corps anti G	Poumon : C et anti-corps anti G
Sy Bémol (poney)(10.1.74)	30 ml de sang Mélanie 120 ml de sérum Mélanie	- 4è jour - 40,2 le 8è jour - 6 jours	10è jour	G et C	Poumon et Foie : G Rein : 0
Bienvenue (cheval)(13.6.74)	150 ml Géronimo	- 16è jour - 40,3 - 9 jours	mort le 24è jour	0	
Sanguine (jument)(11.9.74)	200 ml Fanny } en 2 fois 100 ml Mélanose }	- 7è jour - 40,9 - 2 jours	9è jour	G et C	Poumon : G et C Foie et Rein : G Ganglion : G et C
Poussif (cheval)(14.10.74)	230 ml sérum Sanguine } en 240 ml sang Sanguine } 2 fois	- 4è jour - 40,7 - 3-5 jours	7è jour	G et C	Poumon et Foie : G et C Rein : 0
Annie (âne)(10.12.74)	120 ml sérum Sanguine 120 ml sang Poussif	- 7è jour - 39 - 1 jour	8è jour	G et C	Non recherché
Anatomie (âne)(7.1.75)	200 ml sérum Sanguine 175 ml sang Poussif	- 5è jour - 40,5 - 3 jours	8è jour	G et C	Non recherché

Figures 1 à 16 : Représentation de la courbe de température chez divers équidés infectés expérimentalement par la souche Wyoming de virus AIE en vue de la production d'antigène d'origine splénique.

Pour chaque équidé, est mentionnée l'activité antigénique de l'extrait splénique mesurée par immunodiffusion radiale en présence d'un sérum anti G.

: injection de la souche Wyoming

: injection de dexaméthasone

: sacrifice de l'équidé (mort naturelle pour Letkiss)

figure 1

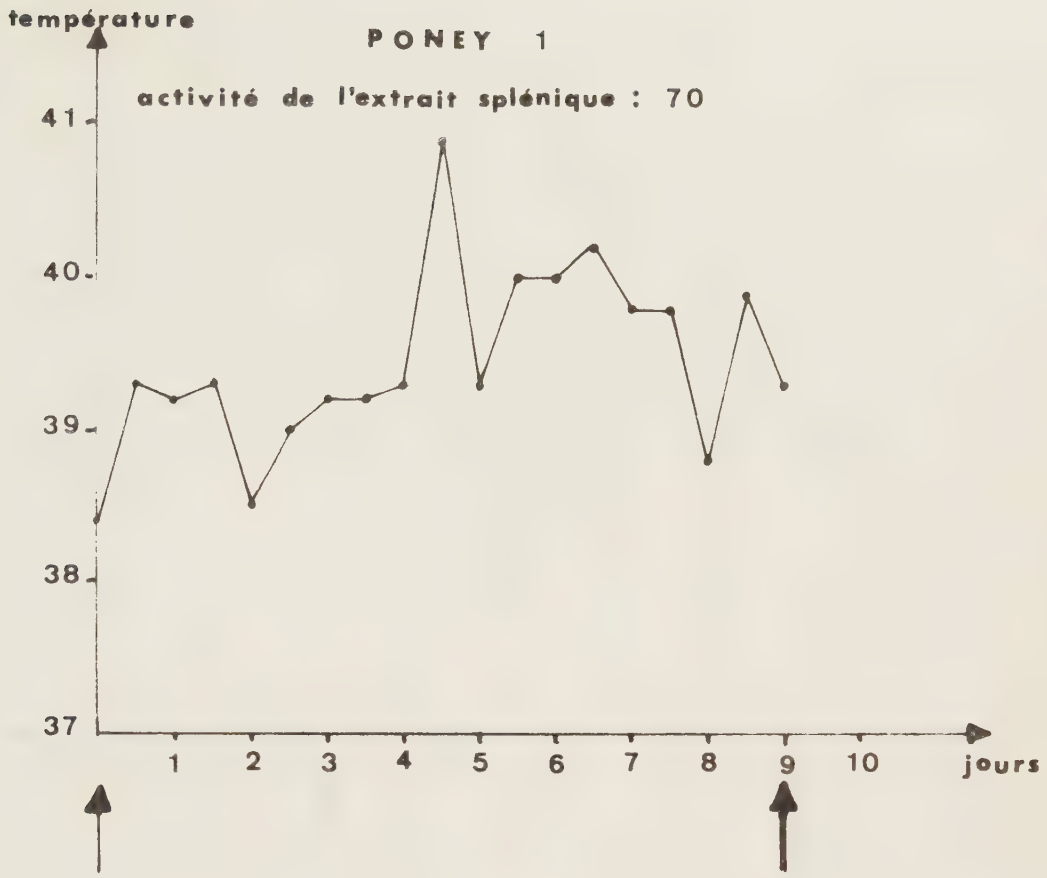


figure 2

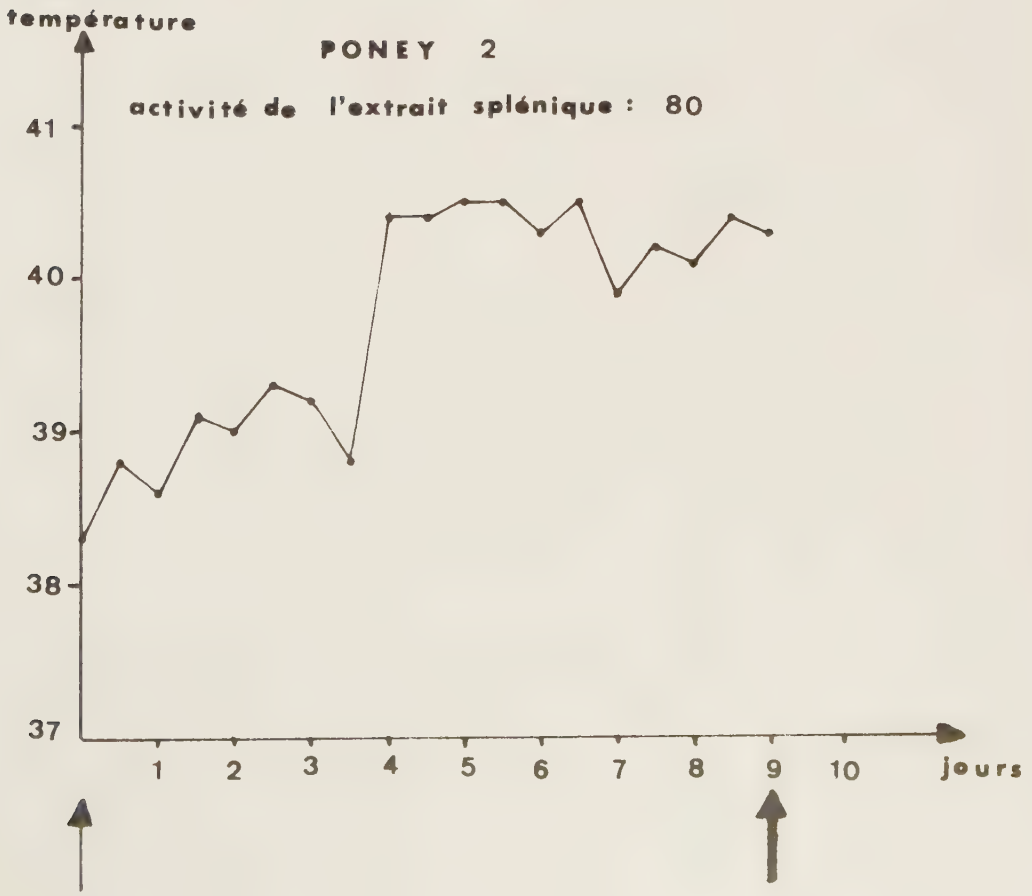


figure 3

figure 4

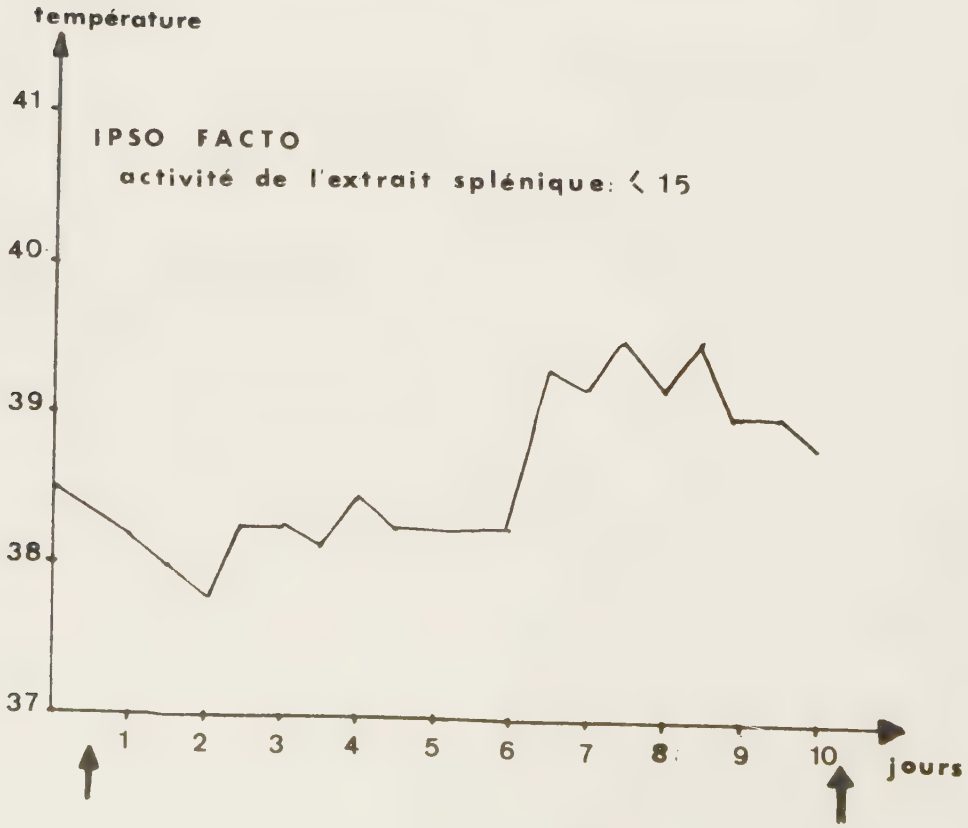


figure 5

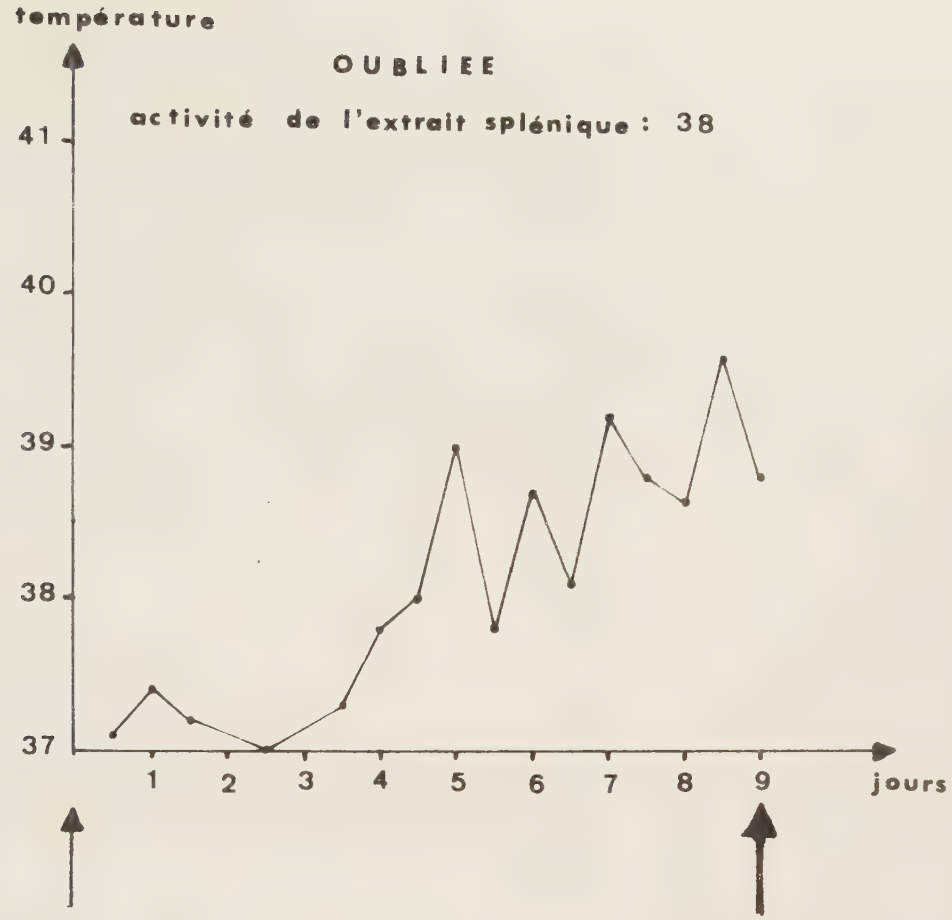


figure 6

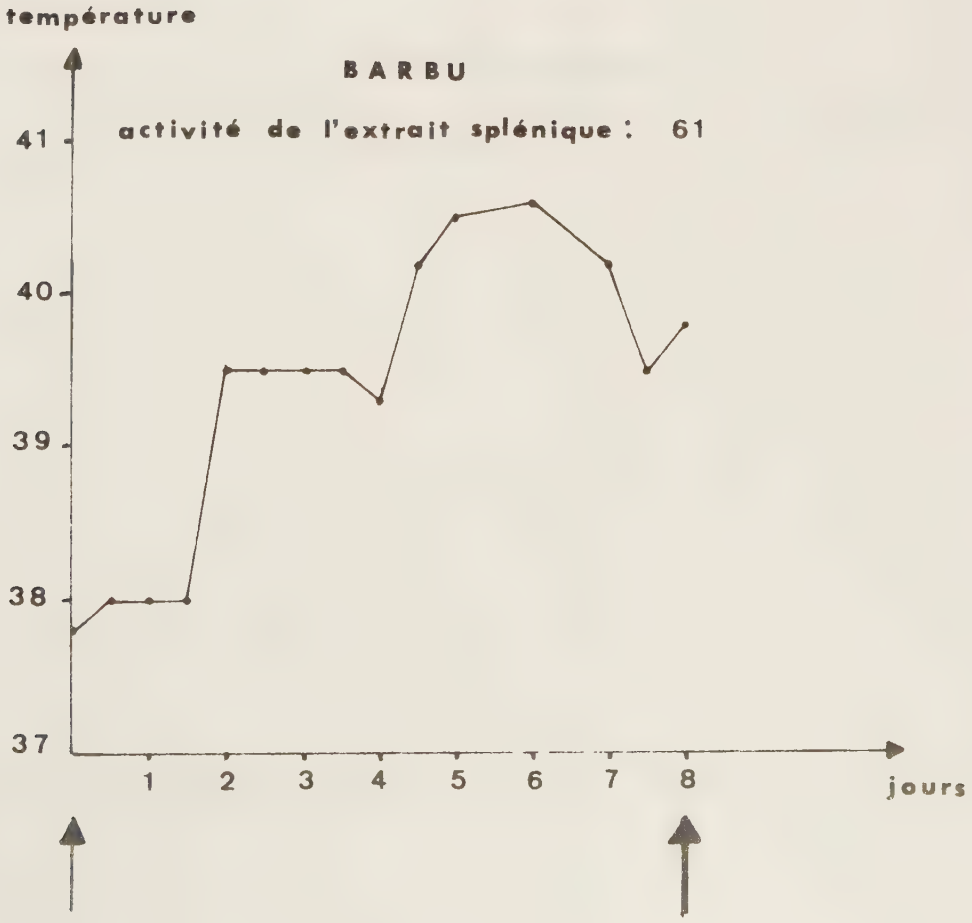


figure 7

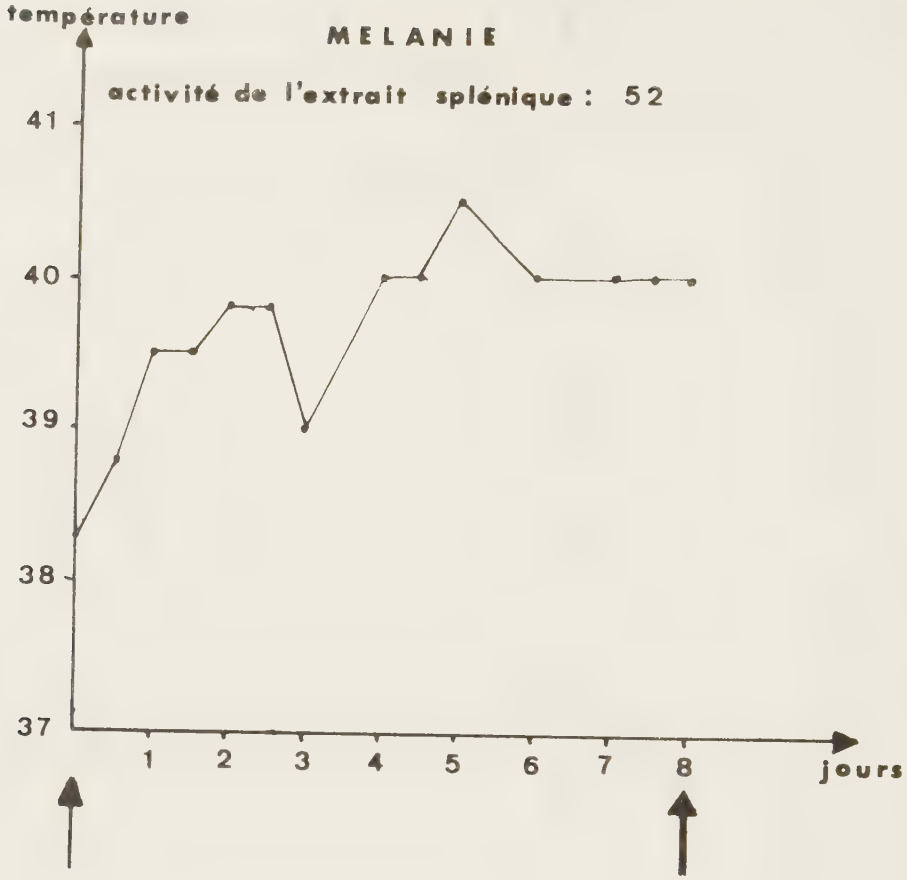


figure 8

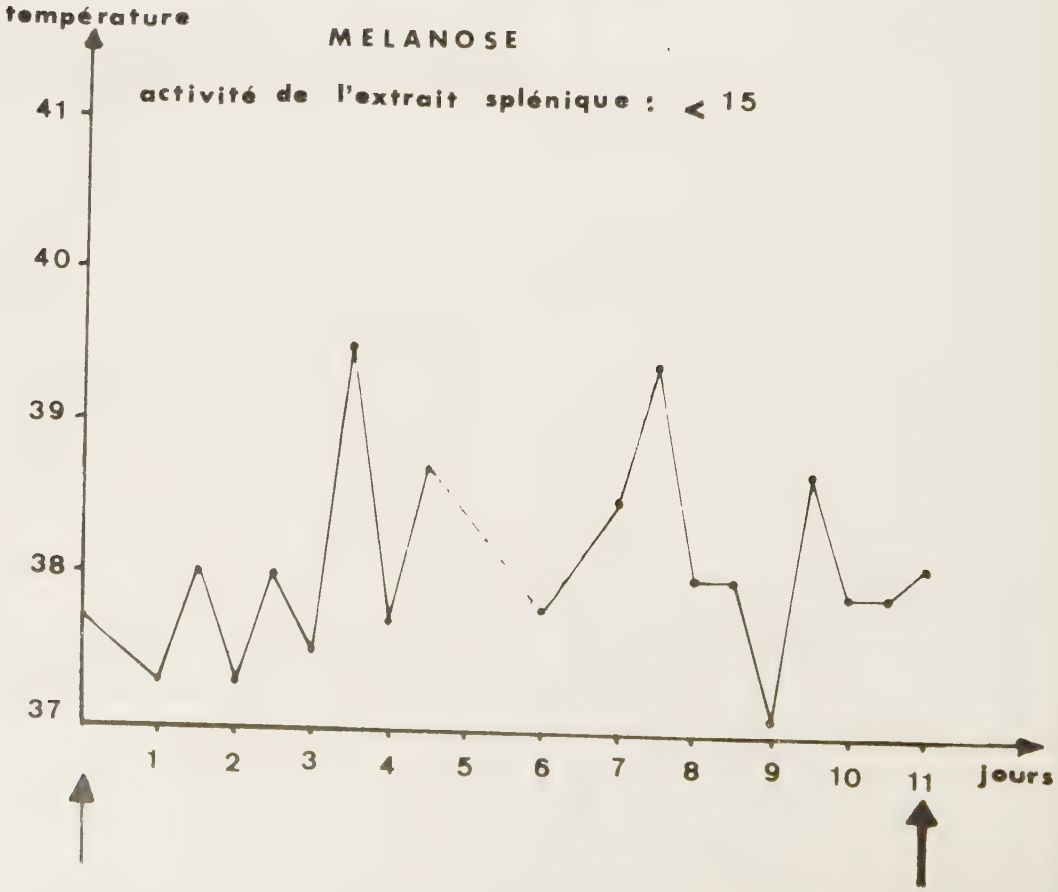


figure 9

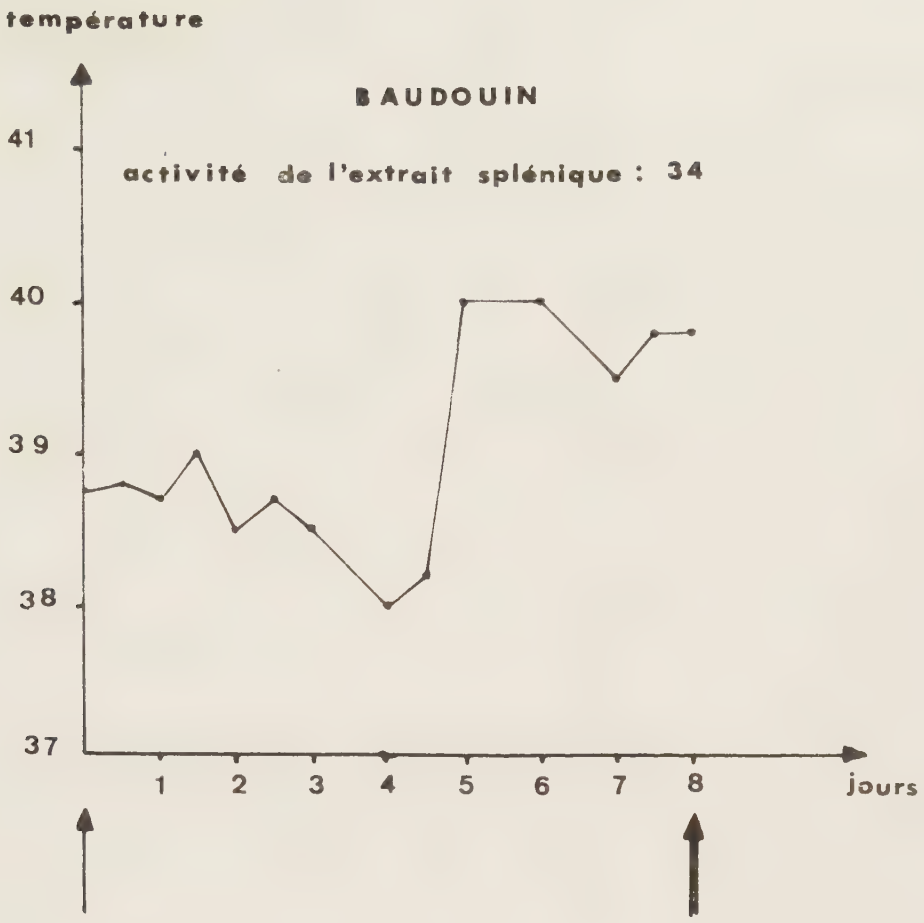


figure IO

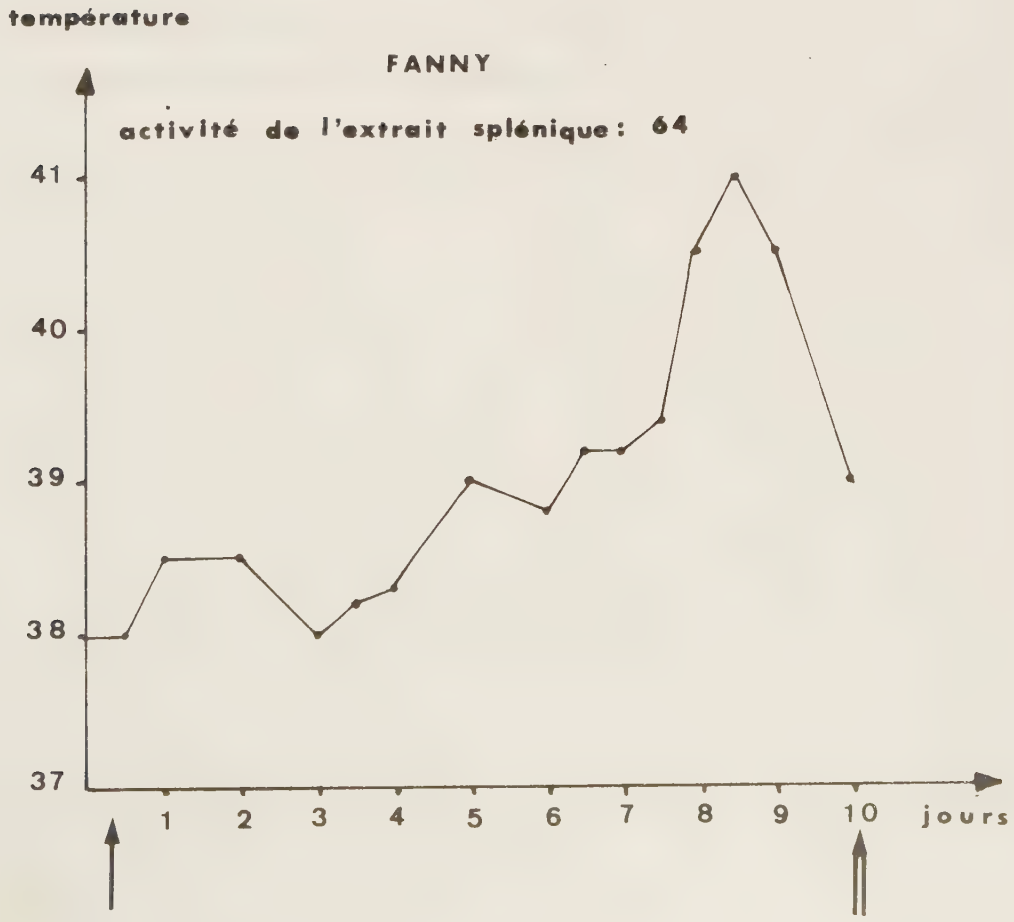


figure 11

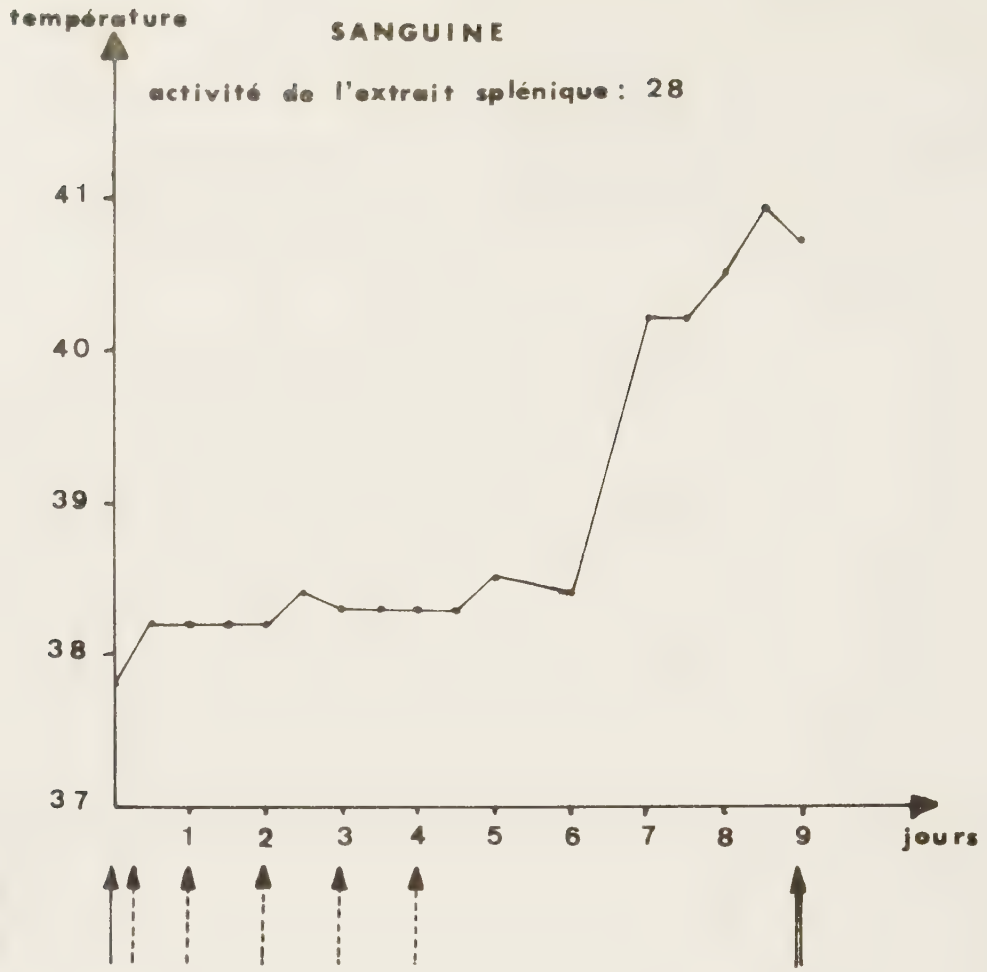


figure 12

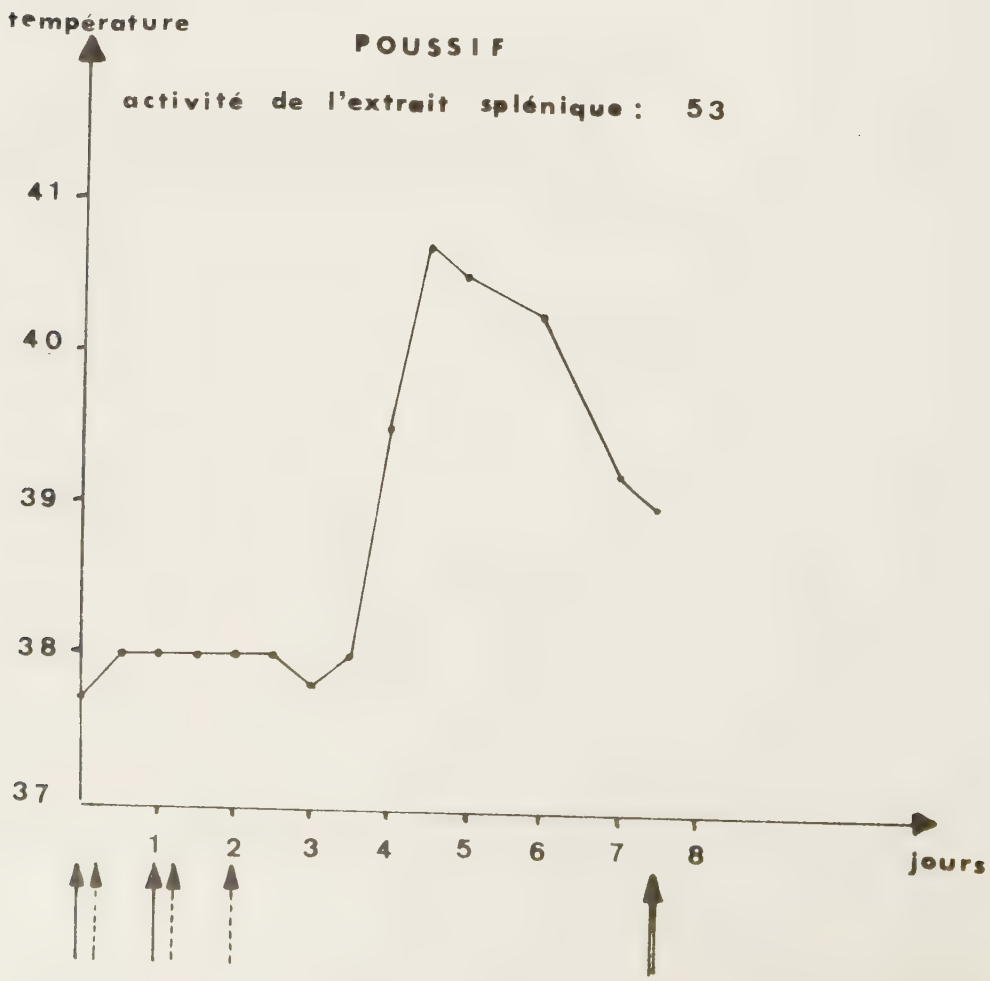


figure 13

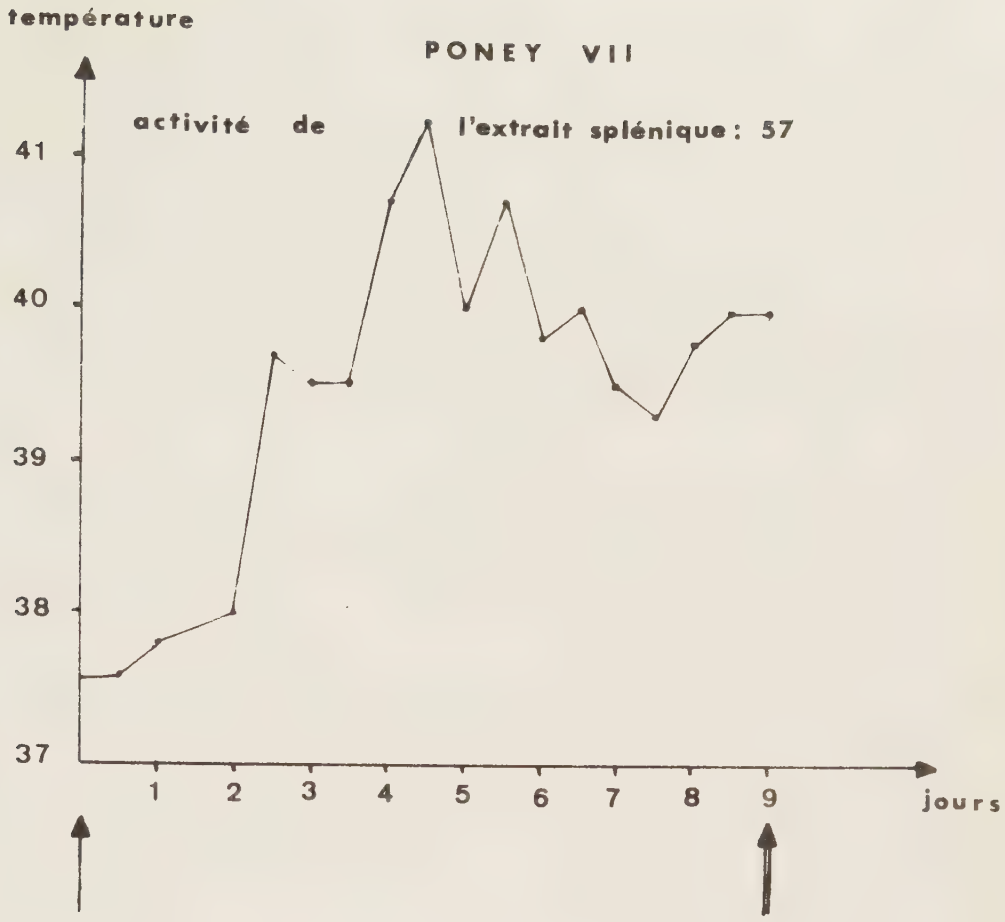


figure 14

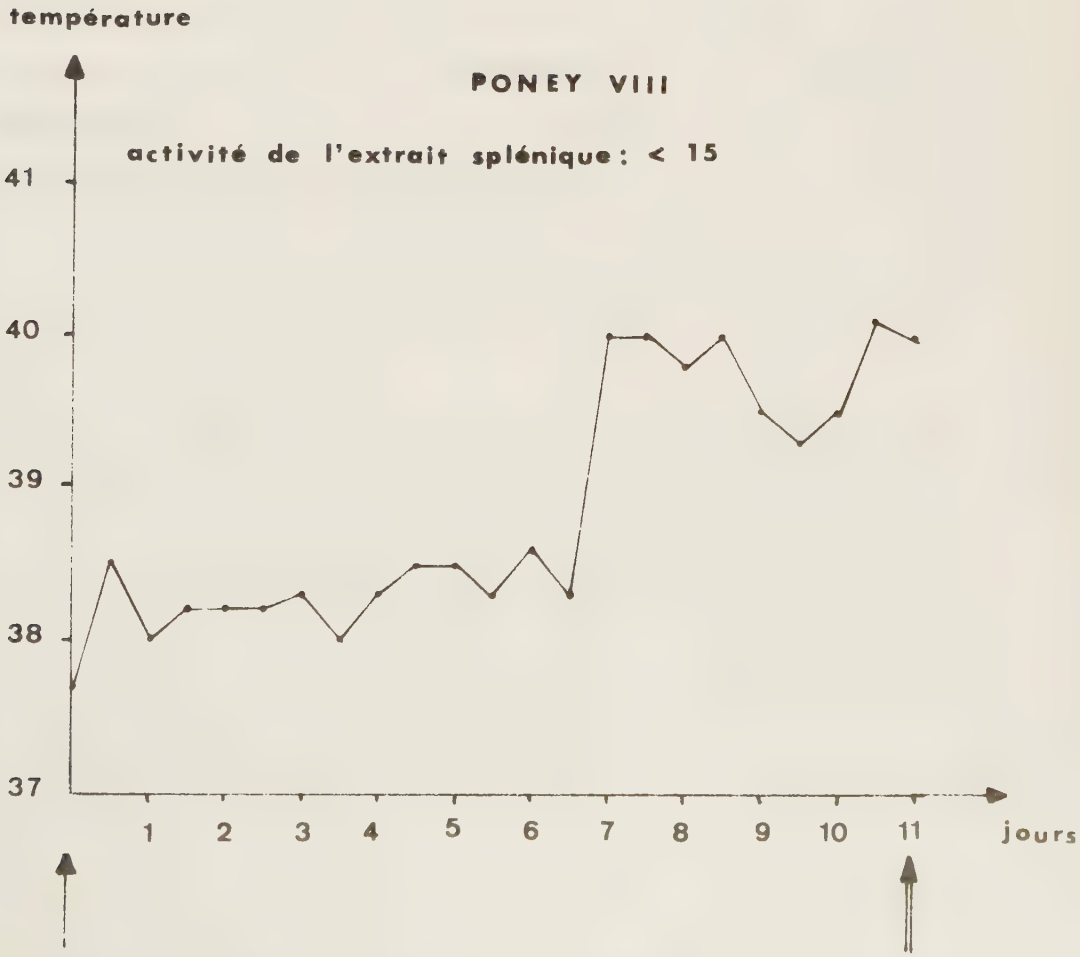


figure 15

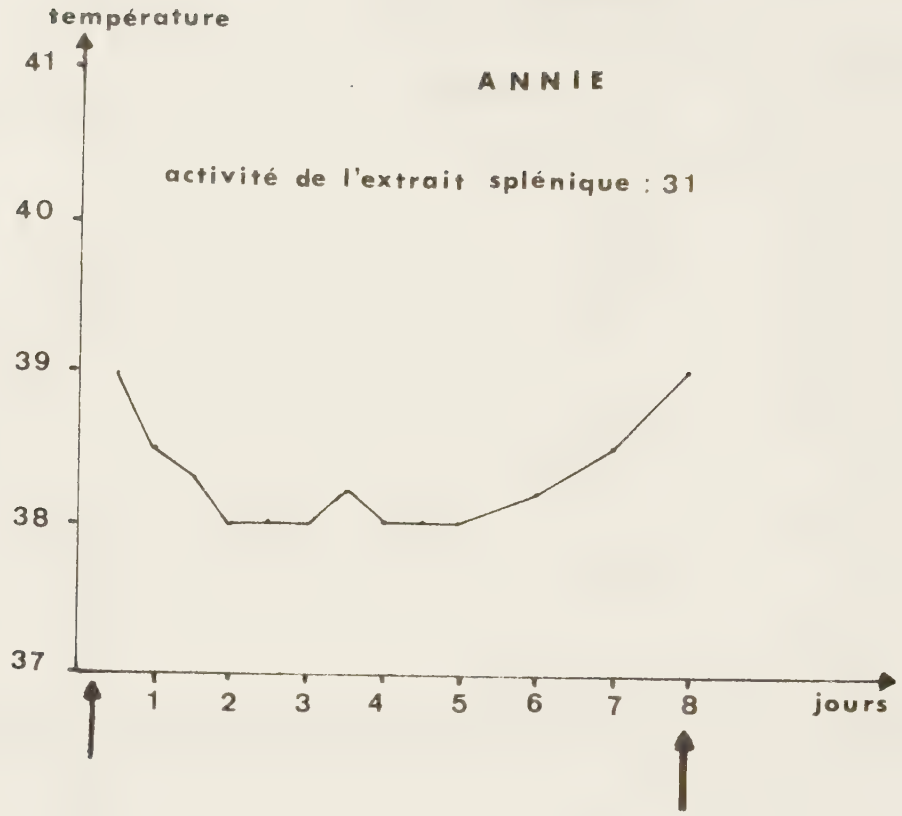
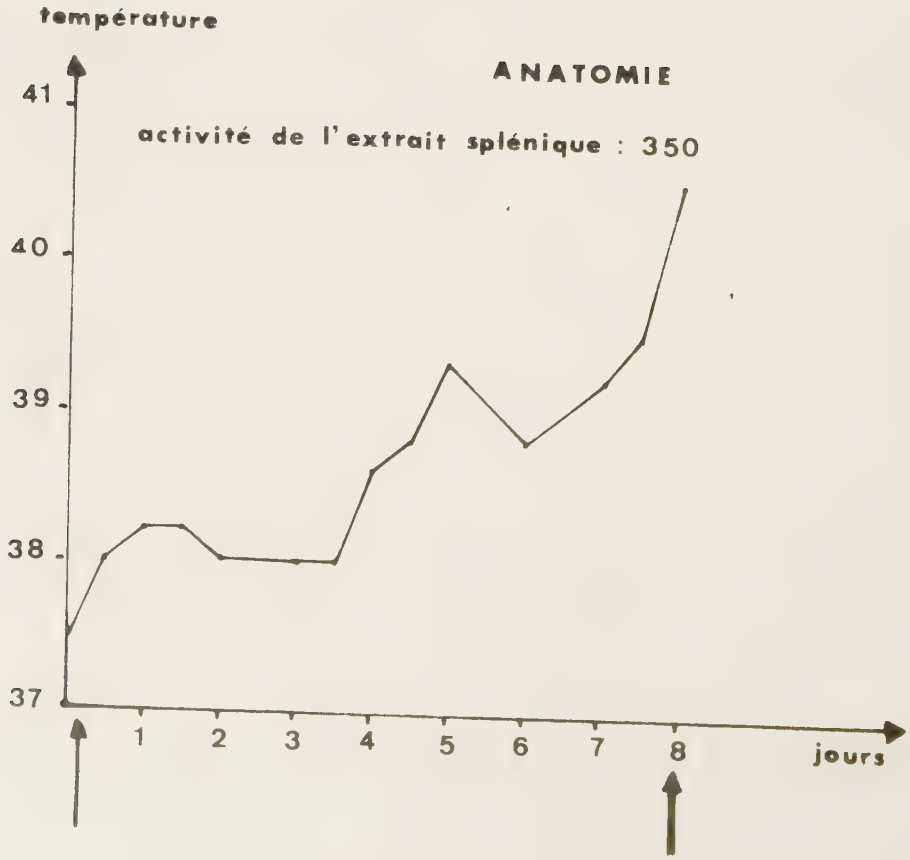


figure 16



apportée par l'apparition tardive d'anticorps anti G (au 57ème jour après l'infection). Au cours de toute cette période, la recherche d'anticorps anti C dans son sérum est restée régulièrement négative. Au jour 191 après la première inoculation, le poney recevait une injection de 0,5 ml de sérum virulent (souche Wyoming) et il mourait 22 jours plus tard, après avoir présenté une réaction fébrile intense. Sa rate contenait des anticorps anti G et du précipitogène C. Il s'avère donc que les synthèses d'antigène G et C peuvent être dissociées au sein d'un organisme infecté par le virus AIE.

Chez le poney Tom Pouce, mort 27 jours après l'inoculation, on a pu noter l'apparition d'anticorps anti G au 15ème jour et leur présence dans le sang le jour de la mort, alors que l'extrait splénique contenait les antigènes G et C (figure a, planche II).

Enfin, la rate de la jument Bienvenue ne contenait ni antigène G ni antigène C.

La présence des précipitogènes G et C dans la rate des équidés étudiés est résumée dans le tableau VIII.

TABLEAU VIII : Présence des précipitogènes G et C dans les extraits spléniques des équidés infectés expérimentalement.

	Anticorps dans le sang	Anticorps dans la rate	Antigènes dans la rate
21 cas	absents	absents	G et C avec G > C
1 cas	absents	absents	G et C avec G < C
1 cas	anti G	anti G	C
1 cas	anti G	absents	G et C
1 cas	anti G anti C		0

.../.

b) Présence des précipitogènes dans d'autres organes

Après la rate, le poumon est l'organe qui renferme le plus régulièrement les antigènes G et C (figure b, planche II).

Sur 18 poumons étudiés issus d'équidés infectés, 15 contenaient une quantité décelable de précipitogène G et 14 du précipitogène C.

Les précipitogènes G et C ont été trouvés également dans d'autres organes, en particulier chez la pouliche Letkiss, dans le rein, le foie, les ganglions lymphatiques ainsi que dans le thymus.

Ainsi, chez les équidés infectés depuis quelques jours par le virus AIE, on trouve assez régulièrement les précipitogènes G et C dans la rate et dans divers autres organes.

c) Etude quantitative du précipitogène G dans la rate

Le précipitogène G est l'antigène utilisé dans le test d'immunodiffusion en gélose pour le diagnostic de l'AIE. Aussi sa préparation en grande quantité est importante et, sur un plan pratique, il est intéressant de déterminer les facteurs qui conditionnent une production optimale de cette substance.

La concentration en précipitogène G dans les extraits spléniques bruts, préparés de façon identique à partir des animaux infectés, a été mesurée par la technique d'immunodiffusion radiale, afin de comparer leur valeur et de tenter de connaitre les facteurs déterminants.

Une préparation antigénique G a servi de référence et reçu arbitrairement le chiffre 100 comme indice d'activité en immunodiffusion radiale. L'étude répétée d'une gamme de dilutions de cet antigène (figures 3 à 10, planche II) a permis d'établir un graphique indiquant la relation entre la surface du cercle délimité par le précipité et la quantité de précipitogène G (figure 17).

Ultérieurement, les surfaces obtenues avec les différentes préparations antigéniques (pures ou diluées) ont été comparées à ce graphique, en tenant compte du résultat obtenu à chaque fois pour le point de référence 50, ce qui a conduit à attribuer à chacun des antigènes étudiés une valeur exprimée par un nombre. Compte-tenu de l'imprécision relative de la lecture du diamètre du cercle, cette technique peut être qualifiée de semi-quantitative et l'erreur sur la mesure est de l'ordre de 15 p. cent. La plus faible activité antigénique mesurable dans le système retenu correspond à la valeur 15 à 20.

.../..

Figure 17 : Etude du précipitogène G en immunodiffusion radiale. Etablissement de la relation entre différentes dilutions du précipitogène G de référence et la surface délimitée par le précipité dans la gélose.

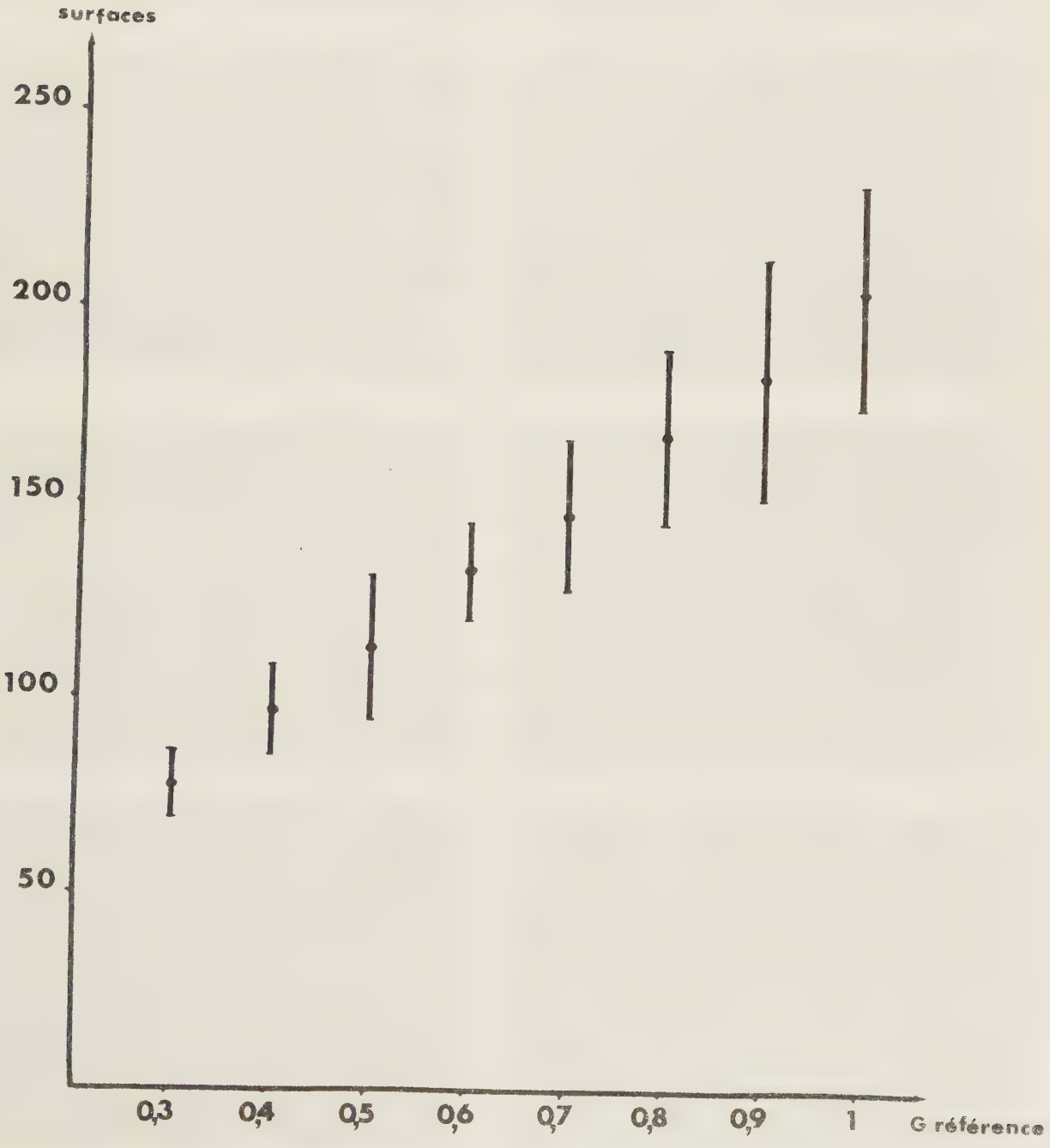


PLANCHE II

Figures 3 à 10 : Immunodiffusion radiale du précipitogène G de référence dans de la gélose contenant 3 p. cent de sérum anti G (sérum positif de référence Alfort). 3 : 30 unités de précipitogène G ; 4 : 40 unités de précipitogène G ; 5 : 50 unités de précipitogène G ; etc...

Figure a : Immunodiffusion en gélose. 1 : Antigènes G et C (Fanny) ; 2 : Sérum positif de référence Alfort ; 3 : Sérum du poney Tom Pouce ; 4 : Extrait splénique du poney Tom Pouce. Le sérum de ce poney, prélevé le jour de la mort, contient des précipitines anti G tandis qu'il est possible de mettre en évidence dans l'extrait splénique les précipitogènes G et C.

Figure b : Immunodiffusion en gélose. 1 : Antigènes G et C (Barbu) ; 2 : Extrait pulmonaire du cheval Baudoin ; 3 : Sérum positif de référence Alfort. On trouve dans le poumon des chevaux infectés par le virus AIE les précipitogènes G et C.

Figure c : Immunodiffusion en gélose . 1 : Antigènes G et C ; 2 : Sérum positif de référence Alfort. La concavité des deux lignes de précipité est tournée vers la source d'anticorps.

Figure d : Immunodiffusion en gélose contenant un sérum anti G et C. 1 : Antigène G et C (Fanny) ; 2 : Sérum positif de référence Alfort (anti G et anti C). La gélose renferme 1 p. cent de sérum positif de référence Alfort qui contient des anticorps anti G et des anticorps anti C. Les deux lignes de précipité sont modifiées dans leur tracé.

Figure e : Immunodiffusion en gélose contenant un sérum anti G. 1 : Antigènes G et C (Barbu) ; 2 : Sérum positif de référence Alfort (anti G et anti C). La gélose contient 5 p. cent d'un sérum anti G (sérum du poney 9). Seule la ligne du précipité G -anti G est modifiée par rapport au tracé habituel.

Figure f : Immunodiffusion en gélose. 1 : Antigènes G et C (Fanny) ; 2 : Sérum positif de référence Alfort ; 3 : Sérum du poney Bianco au jour 276 (figure 71) (titre en anti G : 1/128 ; titre en anti C : 1/16). Le tracé de la ligne de précipité C -anti C est à comparer avec celui de la figure a planche III.

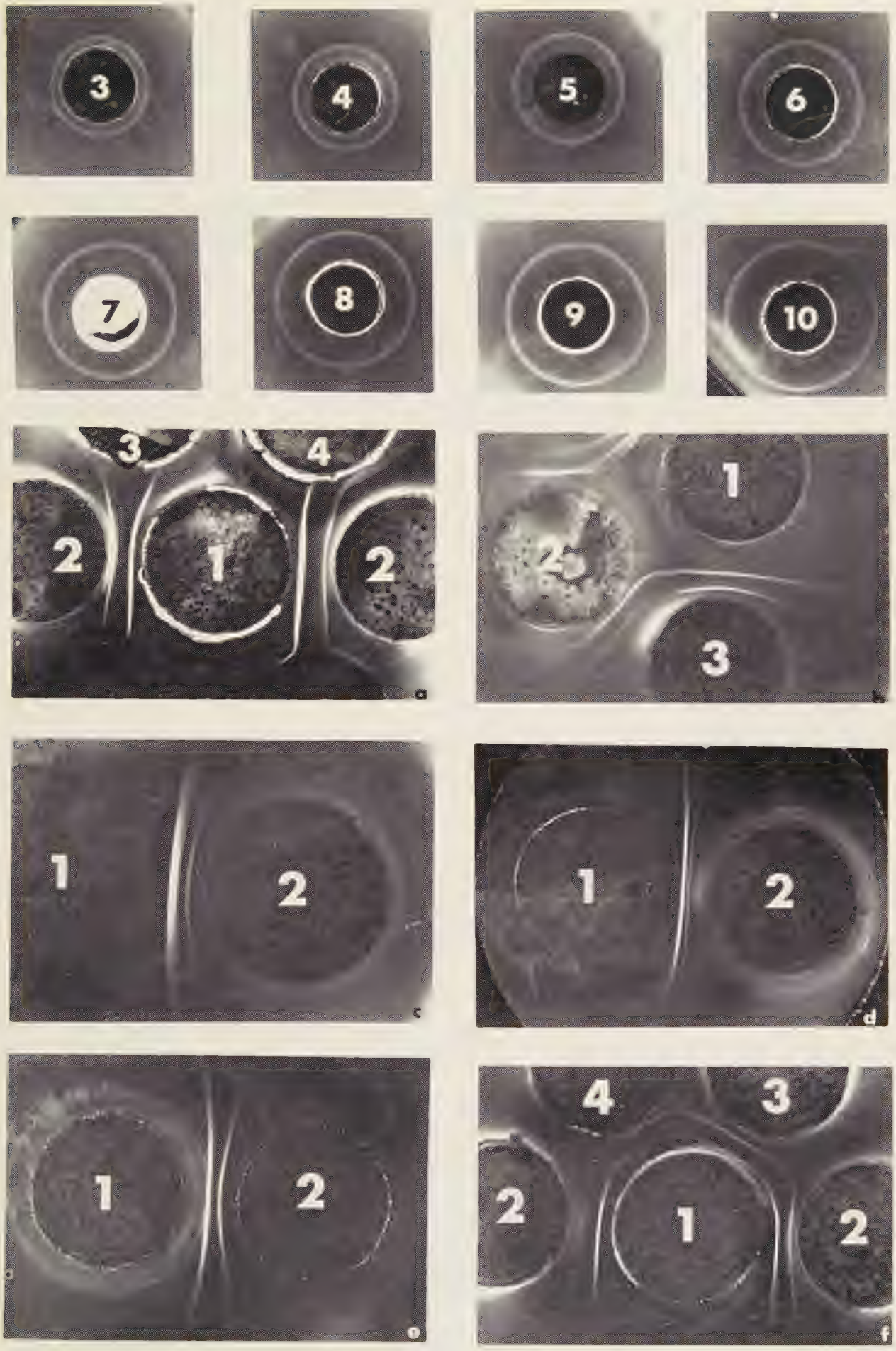


PLANCHE II

Les résultats obtenus avec les extraits spléniques préparés à Alfort sont mentionnés dans le tableau IX et ceux résultant de l'étude d'antigènes reçus de différents pays, sont rassemblés dans le tableau X.

TABLEAU IX : Activité en immunodiffusion radiale en présence d'un sérum anti G, et concentration en protéines des extraits antigéniques bruts obtenus à partir de la rate d'équidés infectés par le virus AIE à Alfort.

Origine de la rate	Activité en immuno-diffusion radiale	Concentration en protéines (mg/ml)
Antigène G de référence	100	60
Edelweiss	17	92
Naudary	84	185
Poney I	70	98
Poney II	80	129
Poney VII	57	112
Oubliée	38	145
Barbu	61	142
Letkiss	42	148
Baudouin	34	91
Fanny	64	146
Rock	38	119
Patriarche	34	158
Bijou	45	172
Mélanie	52	143
Sy Bémol	31	130
Sanguine	28	316
Poussif	53	57
Annie	31	129
Anatomie	350	130

Pour les extraits spléniques de 4 équidés, l'activité antigénique était trop faible pour être valablement appréciée par la technique d'immunodiffusion radiale (Poney VIII, Tom Pouce, Ipso Facto, Mélanose). La valeur antigénique des extraits spléniques préparés à Alfort à partir des autres équidés varie entre 17 et 350.

.../..

TABLEAU X : Etude d'antigènes reçus à Alfort : présence des précipitogènes G et C, activité antigénique en immunodiffusion radiale en présence d'un sérum anti G et concentration en protéines.

Substrat pour la production du virus	Laboratoire d'origine	Présence de G et C	Activité en immunodiffusion radiale	Concentration en protéines (mg/ml)
Equidés	HART (U.S.A.)	G	63	15,4
	PITMAN-MOORE (U.S.A.)	G et C	49	52
	COGGINS (U.S.A.)	G et C	70	25
	BOULANGER (Canada)	G	52	16
	CESAR LORA (Pérou)	G	302	28
	BOHM (Allemagne de l'Ouest)	G	40	46
	RYDEN (Suède)	G	75	31
Culture cellulaire	PEARSON (U.S.A)	G	108	1,2
	NAKAJIMA (Japon)	G et C	210	140

Pour le diagnostic de l'AIE par immunodiffusion, la limite inférieure d'activité des préparations antigéniques semble être voisine de 30. On constate alors, que mis à part 6 préparations faibles (Poney VIII, Tom Pouce, Mélanose, Ipso Facto, Edelweiss, Sanguine), les 17 autres extraits spléniques sont suffisamment actifs pour être utilisés dans le diagnostic de l'AIE.

Pour les équidés infectés avec la souche Wyoming en vue de la production d'antigène, il est possible d'analyser ces résultats en fonction de divers paramètres : l'espèce animale, les modalités d'inoculation, la réaction thermique des équidés infectés, leur date d'abattage, l'influence individuelle.

- Influence de l'espèce productrice

La figure 18 présente l'activité antigénique obtenue à partir d'extraits de rate de chevaux, de poneys et d'ânes. Elle permet de constater qu'il n'existe pas de différence significative dans l'activité des extraits spléniques de chevaux (moyenne : 37) et de poneys (moyenne : 48).

Le nombre d'ânes utilisés est trop faible pour en tirer une conclusion valable. Toutefois, il est démontré que l'âne peut servir de support de

.../..

production du virus AIE en vue de la préparation de précipitogène, ce qui, à notre connaissance, n'avait pas été signalé. L'âne Anatomie s'est révélé, de loin, le meilleur producteur de précipitogène G sur les 25 équidés utilisés (figure 16).

- Influence des modalités d'inoculation

. Souche virale

Tous les équidés sauf un (Tom Pouce) ont été infectés par la souche Wyoming.

Le poney infecté par une souche française n'a présenté qu'une réaction fébrile légère qui nous a fait différer son abattage. Après la mort, survenue au 27ème jour, les antigènes G et C ont été décelés en faible quantité dans sa rate. Compte-tenu du prix de revient des équidés, nous n'avons pas renouvelé l'emploi de souches françaises qui semblent moins virulentes que la souche Wyoming. Cet essai unique n'autorise donc pas à formuler une conclusion certaine.

. Dose d'inoculum

La plus faible dose de sang et de sérum injectée a été de 50 ml (Edelweiss), la plus forte de 470 ml (Poussif). A l'intérieur de ces limites, la quantité de liquide virulent inoculé n'influe guère sur l'activité antigénique de l'extrait splénique.

. Dexaméthasone

L'activité antigénique de l'extrait splénique des deux chevaux ayant reçu de la dexaméthasone n'est pas supérieure à celle des chevaux qui n'ont pas reçu cette substance (figures 11 et 12).

- Réaction thermique

La figure 20 représente la distribution de l'activité antigénique des extraits spléniques en fonction de la date d'apparition de la fièvre. Lorsque celle-ci se manifeste avant le 6ème jour qui suit l'inoculation, l'activité antigénique semble légèrement supérieure.

En général, les équidés réagissant par une forte fièvre ($\geqslant$ 40°3C), après l'inoculation du virus AIE, fournissent des préparations antigéniques de meilleure qualité que celles des animaux qui ne présentent qu'une réaction thermique modérée (figure 19). Cependant cette relation n'est pas constante et, par suite, on peut s'interroger sur le bien fondé de la décision du jour d'abattage en fonction de l'évolution de la température.

.../..

Figure 18 : Représentation schématique de l'activité antigénique (précipitogène G) des extraits spléniques d'équidés en fonction de de l'espèce dont provient la rate.

Figure 19 : Représentation schématique de l'activité antigénique (précipitogène G) des extraits spléniques d'équidés en fonction de la température maximale atteinte par les animaux.

Figure 20 : Représentation schématique de l'activité antigénique (précipitogène G) des extraits spléniques d'équidés en fonction de la date d'apparition de l'hyperthermie.

Figure 21 : Représentation schématique de l'activité antigénique (précipitogène G) des extraits spléniques d'équidés en fonction de la date d'abattage des animaux.

figure 18

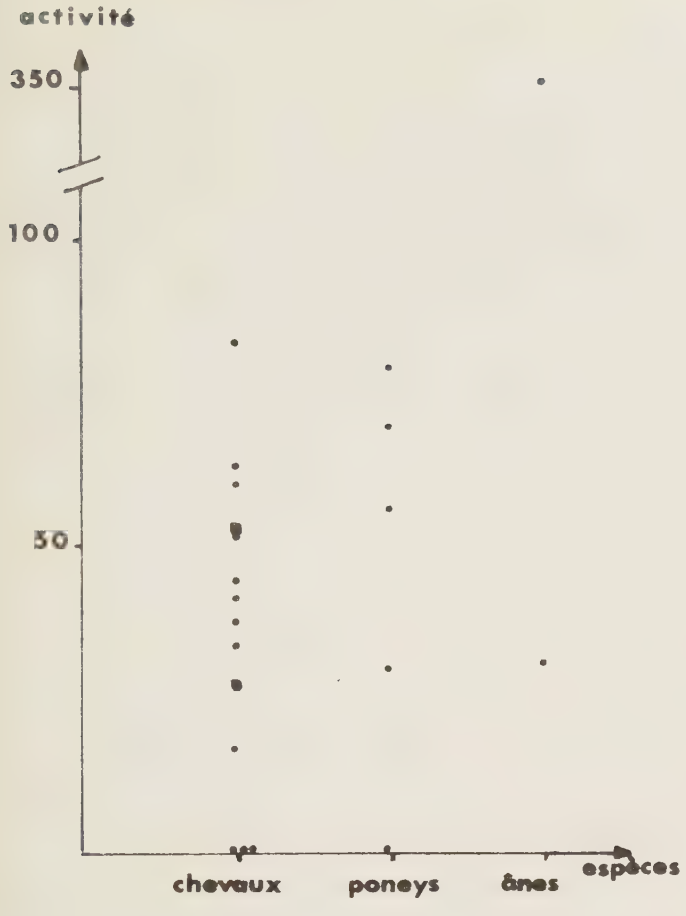


figure 19

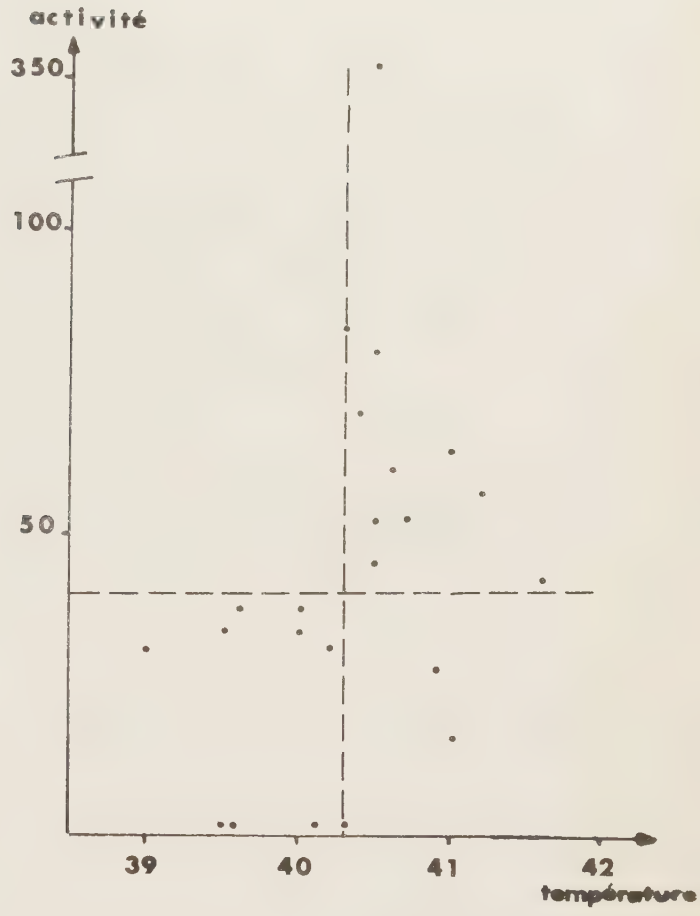


figure 20

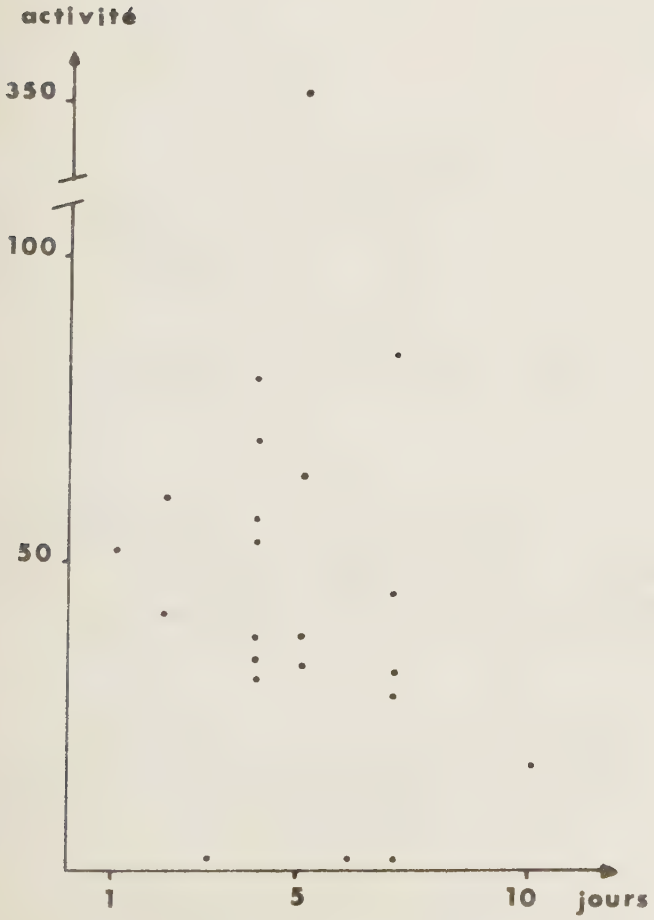
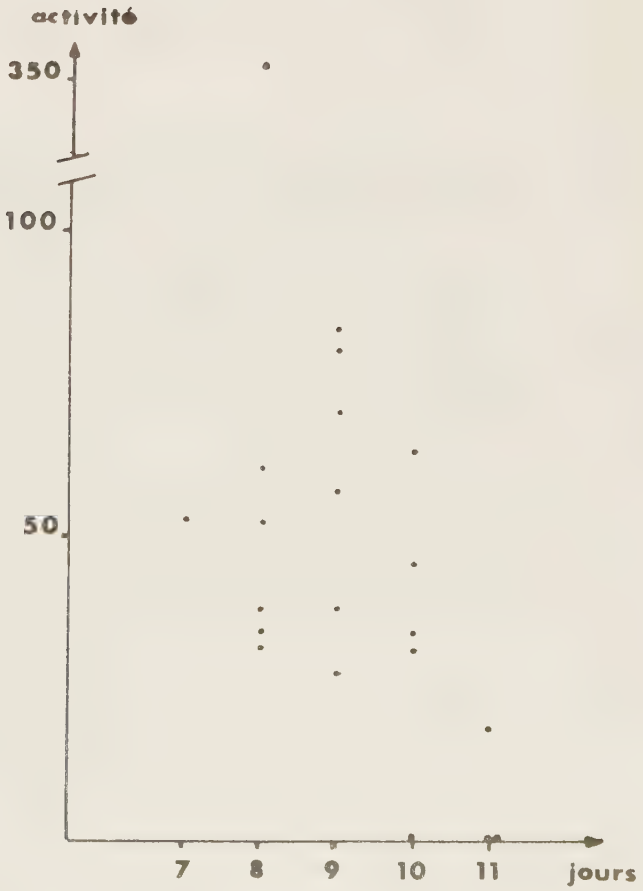


figure 21



- Date d'abattage

La plupart des équidés ont été sacrifiés entre le 8ème et le 11ème jour, en fonction de l'allure de la courbe thermique. Lors de réaction fébrile précoce et intense, les animaux ont été sacrifiés tôt ; au contraire, lors de réaction tardive et faible, ils ont été sacrifiés le 11ème jour. Pour les deux ânes, la date d'abattage n'a pas été déterminée en fonction de la courbe thermique mais était prédéterminée et fixée au 8ème jour.

La figure 21 représente l'activité antigénique des extraits spléniques en fonction de la date d'abattage. La meilleure activité correspond aux équidés abattus aux 8ème et 9ème jours. L'activité est plus faible pour les équidés sacrifiés tardivement (11ème jour).

Cependant, les résultats obtenus avec 3 équidés montrent que les antigènes peuvent être produits beaucoup plus tôt et retrouvés plus tard que ces délais moyens de 8 à 11 jours.

Ainsi, 5 jours seulement après l'infection, la pouliche Letkiss possédait des précipitogènes G et C dans la plupart des organes.

A l'inverse, il était possible d'extraire les antigènes G et C à partir de la rate du poney Tom Pouce, mort le 27ème jour, et l'antigène C, à partir de la rate du poney Leticia, mort le 22ème jour après l'infection par la souche Wyoming.

- Influence de l'individu

Des animaux de même âge, de même race, infectés à la même période, dans des conditions semblables, peuvent réagir de façon tout à fait différente.

Il en est ainsi par exemple de la pouliche Letkiss et du poulain Ipso Facto. La première a présenté dès le lendemain de l'inoculation une fièvre qui a atteint 41,6°C et elle est morte le 5ème jour après l'inoculation (tableau VII et figure 3). Les précipitogènes G et C ont été retrouvés dans la plupart de ses organes : rate, poumons, reins, foie, ganglions lymphatiques et thymus.

Chez le second, au contraire, la fièvre n'est apparue qu'au 6ème jour ; la température maximale n'a été que de 39,5 °C (tableau VII et figure 4) et l'extrait splénique s'est révélé pauvre en antigènes G et C tandis que les autres organes en étaient dépourvus.

Ainsi, une sensibilité individuelle, difficilement prévisible, conditionne la production des précipitogènes de l'AIE par les équidés.

.../..

a) Etude quantitative du précipitogène C

A l'instar de ce qui a été utilisé pour le précipitogène G, une technique d'immunodiffusion radiale reposant sur l'emploi d'un sérum monovalent anti C a permis de mesurer la concentration de ce précipitogène dans les extraits antigéniques d'origine splénique. De la même façon, un antigène C de référence a été choisi arbitrairement et son activité a été fixée à 100 (figure 22).

Le tableau XI rassemble des exemples de résultats obtenus.

TABLEAU XI : Activité en immunodiffusion radiale en presence d'un sérum anti C, des extraits antigéniques bruts obtenus à partir de la rate d'équidés infectés par le virus AIE.

Antigène C de référence	Naudary	Poney II	Barbu	Mélanie	Letkiss	Poussif	Rate envoyée par Coggins	Poney I	Poney VII	Sy Bémol
100	120	104	104	85	60	111	57	< 20	< 20	< 20

On peut donc titrer le précipitogène C par immunodiffusion radiale.

2) Culture cellulaire

Des extraits antigéniques ont été préparés à partir de surnageant de culture de cellules E.D. infectées chroniquement par le virus AIE à différents passages.

Pour chaque lot produit, on a recherché les précipitogènes G et C, mesuré l'activité du précipitogène G en immunodiffusion radiale et déterminé la concentration en protéines. Ces différents résultats sont mentionnés dans le tableau XII.

La lignée cellulaire E.D. infectée par le virus AIE permet donc de produire les précipitogènes G et C.

.../..

Figure 22 : Etude du précipitogène C en immunodiffusion radiale. Etablissement de la relation entre différentes dilutions du précipitogène C de référence et la surface délimitée par le précipité dans la gélose.

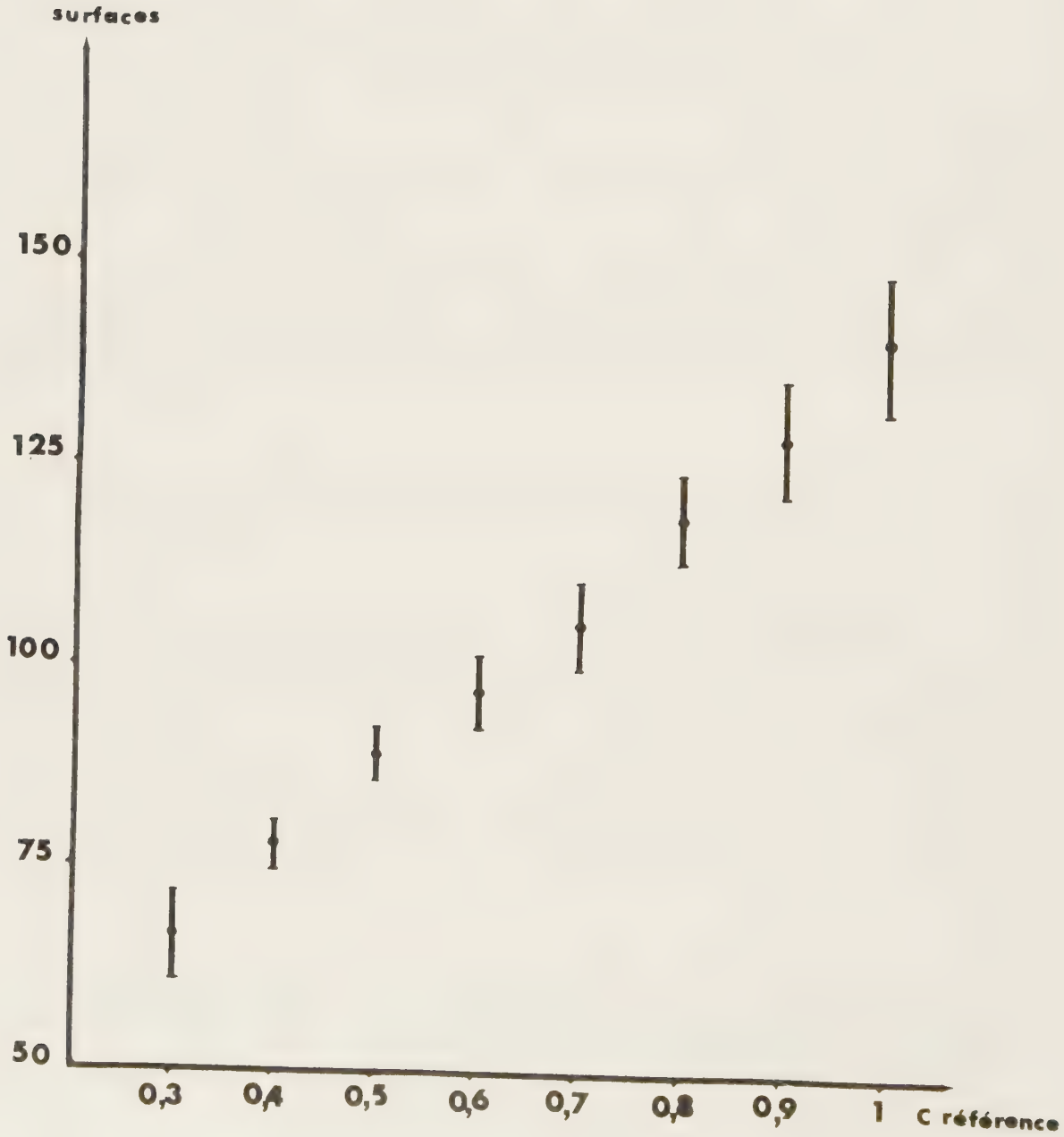


TABLEAU XII : Résultats de l'étude d'antigènes préparés à Alfort à partir de culture cellulaire (cellules E.D.) infectée par une souche de virus AIE.

Origine du lot	Présence de G et C	Activité du précipitogène G	Concentration en protéines (mg/ml)
- Cellules E.D. 36 (Pearson)			
. passage 37	G	73	4,9
. passage 39	G	48	5,5
- Cellules E.D. Alfort (infectées aux passages 17, 22, 23 et 25)			
. passage 28	G	20	2,3
. passage 30	G	43	2,7
- Cellules E.D. 23 (Pearson)			
. passage 23	G	27	3,6
. passage 32	G, traces de C	210	3,7
. mélange passages 24 à 35			
1ère extraction	G et C	300	6,1
2ème extraction	G et C	70	11

B/ Isolement et purification des précipitogènes G et C

Les précipitogènes G et C ont été isolés et purifiés à partir d'extraits de rate de chevaux ou de cultures cellulaires infectées par le virus AIE.

1) Extraits d'origine splénique

Deux procédés d'extraction des précipitogènes G et C ont été utilisés parallèlement et comparés.

a) Obtenus par cycles de congélation-décongélation

L'extrait est constitué par le surnageant d'une centrifugation d'un broyat de rate soumis à plusieurs cycles de congélation et décongélation (cf techniques).

.../..

L'activité du précipitogène G et celle du précipitogène C, en immunodiffusion radiale, ainsi que la concentration en protéines, sont déterminées, avant de soumettre cette préparation brute à différentes techniques : précipitation par le sulfate d'ammonium, chromatographie sur DEAE cellulose, gelfiltration sur Séphadex G 75 ou ACA_{54}.

- Précipitation par le sulfate d'ammonium

Dans les conditions techniques antérieurement définies, la précipitation par le sulfate d'ammonium permet de séparer les précipitogènes G et C. D'une manière très générale, les extraits spléniques provenant de différents équidés ont fourni des résultats semblables à ceux mentionnés dans le tableau XIII.

TABLEAU XIII : Séparation des précipitogènes G et C par précipitation au sulfate d'ammonium. Le nombre de croix indique la quantité d'antigène retrouvé.

	Concentration en sulfate d'ammonium			
	0-22 p. cent	22-40 p. cent	40-60 p. cent	60-100 p. cent
Précipitogène G	-	++++	+	-
Précipitogène C	-	-	+	++++

Dans ce tableau on constate que les préparations obtenues entre 22 et 40 p. cent de sulfate d'ammonium ne contiennent que le précipitogène G, et celles correspondant à plus de 60 p. cent, que le précipitogène C. De légères variations sont constatées en fonction de la rate d'origine.

Le rendement de la précipitation du précipitogène G par le sulfate d'ammonium (89 p. cent) ainsi que la purification (facteur 2) sont indiqués dans le tableau XIV, qui rassemble les résultats obtenus au cours de l'étude comparée des deux techniques d'extraction des précipitogènes à partir de la rate.

- Chromatographie sur DEAE cellulose

Les précipitogènes G et C séparés par la précipitation au sulfate d'ammonium sont ensuite soumis à une chromatographie sur DEAE cellulose (cf techniques).

Le tracé obtenu pour le précipitogène G est représenté par la figure 23.

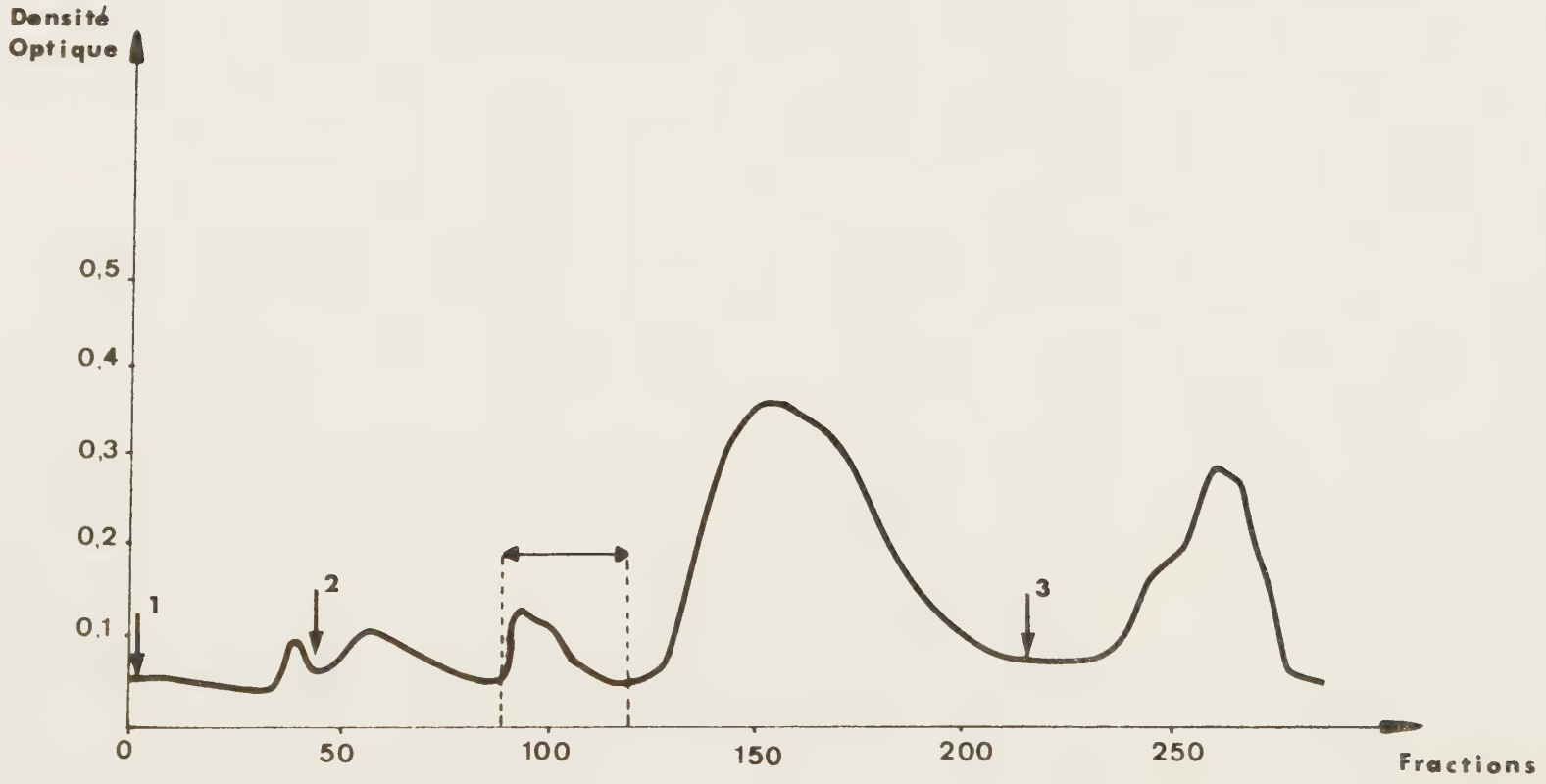
.../..

TABLEAU XIV : Extraction et purification de l'antigène G à partir de 12 grammes de la rate de Poussif par deux techniques : dans chaque rangée, les chiffres de la ligne supérieure correspondent à la technique d'extraction par congélation et décongélation, ceux de la ligne inférieure à la technique d'extraction par l'éther. Pour la chromatographie sur DEAE cellulose, ont été indiqués les chiffres relatifs au dépôt et ceux de la fraction contenant le précipitogène G.

Technique	Volume (ml)	Concentration en protéines (mg/ml)	Activité G en immunodiffusion radiale	Activité antigénique totale	Purification
Premier traitement de la rate	3 4,5	149 47	120 37	360 168	0,8 0,8
Deuxième traitement	9,6 26	72 20,8	50 23	484 598	0,7 1,1
Troisième traitement	8 8,4	13,5 16	27 19	216 159	2 1,2
Quatrième traitement	9,4 8,4	12,7 10,5	16 19	155 159	1,3 1,8
Mélange total	26,5 24	37 26	28 34	742 816	1 1,1
Précipitation au sulfate d'ammonium (22-40 p. cent)	16,5 4,2	21 17,1	39 91	660 382	1,9 5,3
Précipitation au sulfate d'ammonium (40-60 p. cent)	2,8 3	44 28,5	0 26	78	0,9
Chromatographie sur DEAE cellulose	2,2 → 0,32 1,1 → 1,2	19 → 6,1 18,1 → 1,8	32 → 27 76 → 21	74 → 11,5 84 → 25	6 11,7

figure 23 : Chromatographie du précipitogène G sur DEAE cellulose.

En 1 : Dépôt du précipitogène en tampon phosphate 20 mM, pH 7,9.
En 2 : Début du gradient linéaire tampon phosphate 50 mM, pH 7,9 - tampon phosphate 100 mM, Nacl 400 mM, pH 7,9.
En 3 : Tampon phosphate 100 mM, Nacl 1 M, pH 7,9.
Le précipitogène G est retrouvé dans la partie encadrée par les pointillés.



Le rendement de cette technique (16 p. cent) et la purification apportée (facteur 3,5) sont indiqués dans le tableau XIV. Dans d'autres essais la purification est restée de l'ordre de 4 à 5, mais le rendement a atteint 75 p. cent.

Avec le précipitogène C, le passage sur DEAE cellulose fournit le résultat présenté par la figure 24.

- Gelfiltration sur Sephadex G 75 et ACA_{54}

Le précipitogène G passé sur DEAE cellulose est ensuite soumis à une filtration sur Sephadex G 75 ou sur ACA_{54}.

La figure 25 et le tableau XV représentent un exemple de résultats obtenus sur ACA_{54}.

TABLEAU XV : Gelfiltration du précipitogène G d'origine splénique sur ACA_{54}.
Seule la partie médiane de la fraction contenant le précipitogène après passage sur DEAE cellulose a été retenue dans ce tableau. Le rendement total est proche de 50 p. cent et la purification de l'ordre de facteur 2.

	Volume (ml)	Concentration en protéines (mg/ml)	Activité G en immunodiffusion radiale	Activité antigénique totale	Pureté
Précipitogène G déposé	5,6	6	43	241	7,1
Précipitogène G récupéré	3	2,4	32	96	13,5

b) Obtenus par extraction à l'éther

Deux fragments de même poids (12 grammes) d'une même rate (cheval Poussif) ont été utilisés pour étudier de façon comparée le rendement et la purification obtenus par la séquence : précipitation au sulfate d'ammonium, chromatographie sur DEAE cellulose, sur l'antigène G extrait par cycles de congélation-décongélation ou par l'éther. Le tableau XIV rassemble les résultats de cette étude.

On y constate :

- que le rendement de chacune de ces deux techniques pour l'extraction totale du précipitogène est très voisin ;
- que la "pureté" du produit obtenu est également semblable ;
- que la purification apportée par la précipitation au sulfate d'ammonium semble deux fois plus importante avec l'antigène extrait par l'éther

.../..

figure 24 : Chromatographie du précipitogène C sur DEAE cellulose.

En 1 : Dépôt du précipitogène en tampon phosphate 35 mM, pH 7,9.
En 2 : Début du gradient linéaire tampon phosphate 50 mM, pH 7,9 - tampon phosphate 100 mM, Nacl 400 mM, pH 7,9.
En 3 : tampon phosphate 100 mM, Nacl 1 M, pH 7,9.

Le précipitogène C est retrouvé dans la partie encadrée par des pointillés.

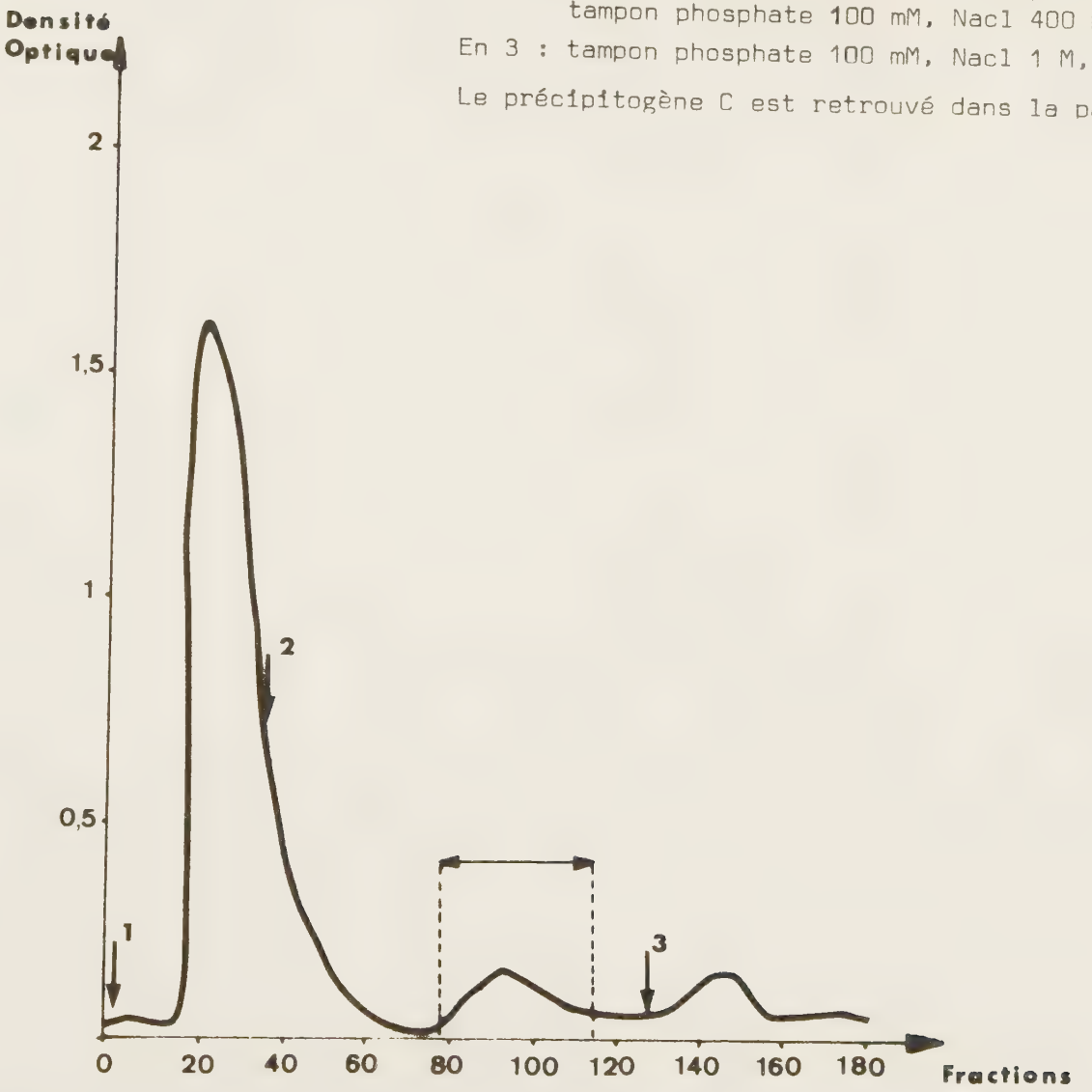
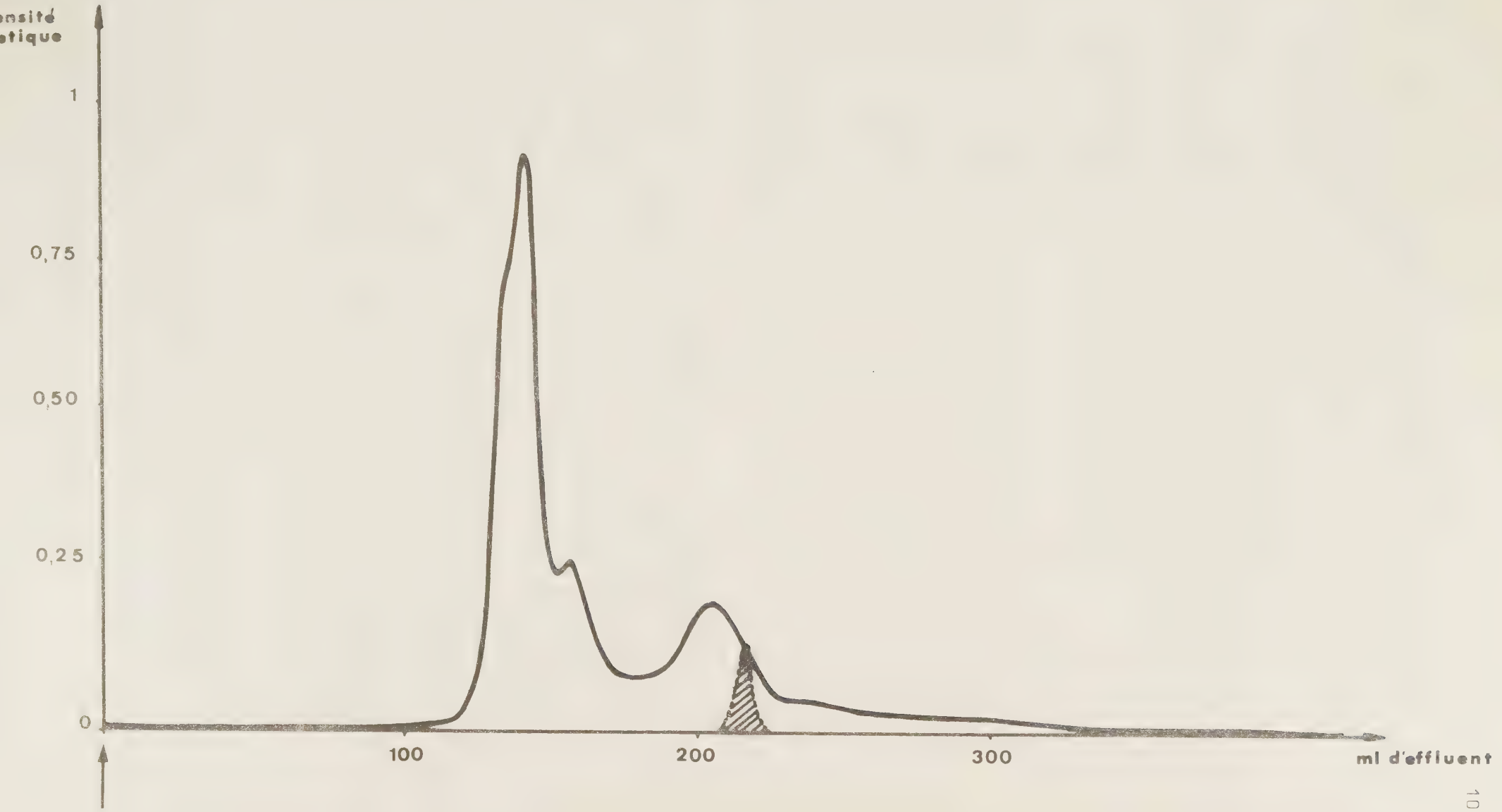


figure 25 : Résultat de la gelfiltration sur ACA_{54} d'une solution du précipitogène G. La flèche indique le moment du dépôt du précipitogène. La partie hachurée représente l'emplacement et la quantité de précipitogène récupéré.



qu'avec l'antigène préparé par congélation-décongélation. Cet avantage se maintient après passage sur DEAE cellulose. La pureté de l'antigène G, après emploi de ces techniques, demeure néanmoins inférieure ou voisine de celle de l'antigène brut préparé en culture cellulaire.

2) Antigènes d'origine cellulaire

La pureté initiale du précipitogène G produit en culture cellulaire est bien supérieure à celle du précipitogène obtenu à partir de la rate. Le rapport

$$\frac{\text{activité antigénique en immunodiffusion radiale}}{\text{concentration en protéines}}$$

pour l'antigène G, est en effet compris, en moyenne, entre 0,2 et 0,8 pour les extraits bruts d'origine splénique. Dans le meilleur des cas, pour l'extrait splénique de l'âne Anatomie, il est de 2,7 (tableau IX). Pour le précipitogène G produit en culture cellulaire, il est le plus souvent voisin de 10 ou supérieur (tableau XII). Il atteint même 50 pour l'extrait préparé à partir des passages 24 à 35 sur cellules E.D. (tableau XII).

La pureté du précipitogène G produit en culture cellulaire est donc, en moyenne, 20 fois supérieure à celle du précipitogène provenant de la rate.

La préparation de précipitogènes G et C très purifiés, en vue de l'étude de leurs propriétés physiques et chimiques, doit donc être réalisée préférentiellement à partir de culture cellulaire.

L'extrait antigénique préparé à partir du surnageant de cellules E.D. infectées par le virus AIE a été soumis à une chromatographie sur DEAE cellulose.

Le résultat obtenu est représenté sur la figure 26. Cette technique ne permet pas de séparer complètement les deux précipitogènes G et C.

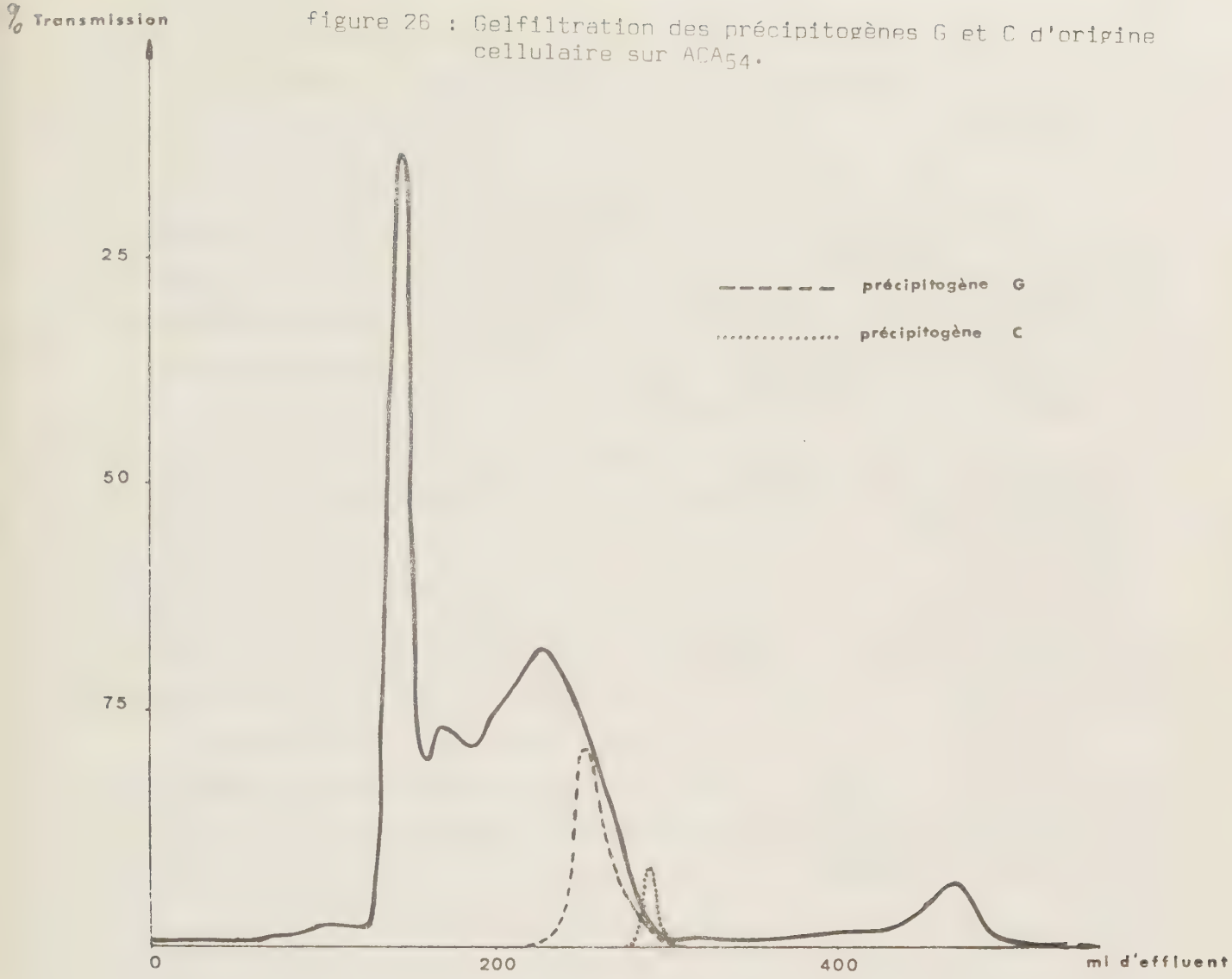
Les précipitogènes G et C d'origine splénique ou cellulaire, séparés et en partie purifiés par les techniques évoquées ci-dessus ont ensuite été étudiés en vue de déterminer leurs principales propriétés physiques, chimiques et biologiques.

C/ Propriétés des précipitogènes G et C

Les propriétés des précipitogènes G et C ont été étudiées sur des solutions à divers stades de purification (cf ci-dessus) ; spécificité

.../..

figure 26 : Gelfiltration des précipitogènes G et C d'origine cellulaire sur ACA_{54}.



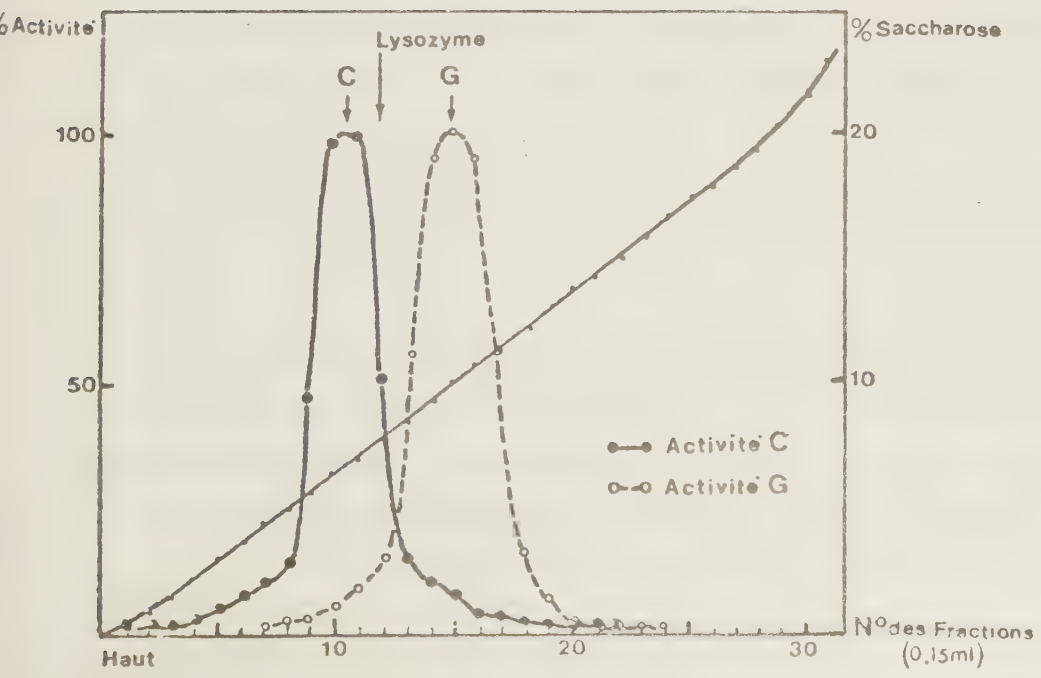


figure 26 b : Répartition de l'activité antigénique G et C après une centrifugation de zone dans un gradient de saccharose 5-20 p. cent.

antigénique, comportement vis-à-vis de différents agents physiques ou chimiques, propriétés physiques et chimiques seront successivement présentés.

1) Spécificité antigénique de G et C

a) L'antigène G n'a été trouvé que dans les tissus de chevaux infectés expérimentalement par le virus AIE et sacrifiés dans un délai relativement court après l'inoculation ou dans les cultures cellulaires infectées par ce même virus. Il n'a pas été décelé dans les extraits de 20 rates provenant de chevaux sains.

Des précipitines anti G n'ont été mises en évidence que dans le sérum d'équidés infectés naturellement ou expérimentalement par le virus AIE. En particulier, il a été démontré que, pour les sérums fournissant une précipitation avec l'antigène G et provenant de chevaux atteints de gourme ou hyperimmunisés avec différents antigènes (toxine tétanique, bacille du rouget) la réaction n'était pas due à une communauté antigénique entre le virus de l'AIE et les agents cités. Ces sérums, confrontés à l'antigène G et à l'un des antigènes bactériens cités ci-dessus, fournissent des lignes de précipités qui se croisent. Par ailleurs, la preuve de l'infection de ces chevaux par le virus AIE a été apportée par inoculation au poney.

b) L'antigène C, de même, n'a été trouvé que dans les tissus de chevaux infectés expérimentalement par le virus AIE ou dans des cultures cellulaires inoculées par ce même virus. Les extraits spléniques de 20 chevaux normaux n'ont pas réagi avec un sérum anti C.

Les précipitines anti C n'apparaissent dans le sérum d'équidés qu'après l'infection par le virus AIE (ou l'injection de précipitogène C).

La parenté antigénique éventuelle de G et C (C monomère d'une substance pouvant se trouver sous forme polymérique, produit de dégradation de l'antigène G...) a été étudiée à l'aide de diverses techniques, toutes destinées à établir l'absence de communauté ou d'identité partielle entre G et C.

c) Relation antigénique entre G et C

. L'hyperimmunisation d'un poney à l'aide de l'antigène C a fourni un sérum ne réagissant qu'avec C et ne formant aucune ligne de précipité avec G. De même, l'injection de précipitogène G à deux poneys (Poney 9 et Gélose) a fourni un sérum reconnaissant exclusivement G.

.../..

. Un sérum de jument infectée, contenant à la fois les précipitines anti G et anti C, a été soumis à des absorptions par les antigènes G et C. Les résultats montrent qu'il est possible d'éliminer les précipitines anti G sans modifier les précipitines anti C et vice-versa.

. L'introduction de sérum anti G et anti C dans la gélose où diffusent ces antigènes modifie l'aspect des arcs de précipité par rapport à celui constaté dans une gélose sans anticorps (figures c et d, planche II). Si l'on n'introduit dans la gélose qu'un sérum anti l'un des deux précipitogènes, seul l'arc du précipité correspondant est modifié (figure e, planche II).

. Enfin, le croisement des lignes de précipité en gélose peut être obtenu de diverses manières et signe l'absence de communauté antigénique entre G et C.

On peut l'obtenir :

- à l'aide de l'extrait antigénique confronté à deux sérums dont les taux de précipitines anti G et anti C sont inversés (figures a et b, planche III),
- à l'aide d'un antigène mixte (d'origine splénique ou cellulaire) opposé à un sérum anti G et un sérum anti C (figure c, planche III),
- à l'aide du précipitogène G et du précipitogène C disposés face à un sérum anti G et anti C (figures d et e, planche III),
- après une électrophorèse en gélose contenant un sérum anti G et anti C (figure g, planche III).

En résumé, le précipitogène G possède la même spécificité antigénique qu'il soit d'origine animale (divers organes d'équidés infectés) ou cellulaire (culture de cellules E.D. ou de leucocytes). Il en est de même pour le précipitogène C. Ce dernier, spécifique du virus AIE au même titre que le précipitogène G, ne possède aucune communauté antigénique avec celui-ci.

2) Comportement des précipitogènes G et C vis-à-vis de différents agents

Les précipitogènes G et C ont été soumis à l'action de divers facteurs physiques ou chimiques : la chaleur, le pH, le courant électrique.

a) Comportement des précipitogènes G et C vis-à-vis de la chaleur (+50°)

Les résultats sont indiqués sous forme d'un tableau. On y constate que le précipitogène C est plus thermolabile que le précipitogène G.

.../..

PLANCHE III

Figure a : Immunodiffusion en gélose. 1 : Antigènes G et C (Fanny) ; 2 : Sérum positif de référence Alfort (anti G et anti C) ; 3 : Sérum du poney Bianco au Jour 227 (figure 45)(titre en anti G : 1/16 ; titre en anti C : 1/64) ; 4 : Sérum du cheval Pasteur. La ligne du précipité C -anti C se forme plus près de la source d'antigène en face du sérum Bianco, et croise la ligne G -anti G (à comparer avec la figure f de la planche II).

Figure b : Immunodiffusion en gélose. 1 : Précipitogènes G et C d'origine splénique ; 2 : Sérum positif de référence Alfort ; 3 : Sérum du poney Bianco au jour 238 (titre anti C : 1/64 ; titre anti G 1/8) ; 4 : Sérum du poney Bianco au jour 255 (titre anti C : 1/32 ; titre anti G : 1/64). Les titres des précipitines anti G et anti C des deux échantillons de sérums prélevés sur le poney Bianco à dix jours d'intervalle, se sont modifiés et, par suite, on constate un croisement des deux lignes de précipité. Comparer avec la figure a de cette planche.

Figure c : Immunodiffusion en gélose. 1 : Antigènes G et C produits à partir de culture cellulaire (NAKAJIMA) ; 2 : Sérum anti C ; 3 : Sérum anti G. Croisement des lignes de précipité G -anti G et C -anti C.

Figure d : Immunodiffusion en gélose. 1 : Précipitogène C ; 2 : précipitogène G ; 3 : Sérum de la jument Sa Kristine. On constate le croisement des deux lignes de précipité.

Figure e : Immunodiffusion en gélose. 1 : Antigène d'origine splénique (CESAR LORA) ; 2 : Antigène C ; 3 : Sérum positif de référence Alfort. Croisement des lignes de précipité G -anti G et C -anti C.

Figure f : Immunodiffusion en gélose. 1 : Antigènes G et C produits en culture cellulaire (NAKAJIMA) ; 2 : Sérum anti C ; 3 : Sérum anti G ; 4 : Sérum positif de référence Alfort (anti G et anti C) ; 5 : Antigène C (origine splénique) ; 6 : Antigène G (origine splénique). Sur ce cliché on constate l'identité de l'antigène G d'origine cellulaire ou splénique, l'identité de l'antigène C d'origine cellulaire ou splénique et le croisement des lignes de précipité G -anti G et C -anti C.

Figure g : Electrophorèse des précipitogènes G et C en agarose contenant du sérum anti C et anti G. 1 : Précipitogènes G et C. Croisement des lignes de précipité G -anti G et C -anti C.

Figure h : Electrophorèse de l'antigène C dans un gel contenant 20 p. cent de sérum anti C (temps de passage du courant : 45 minutes). 1 : Antigène C.

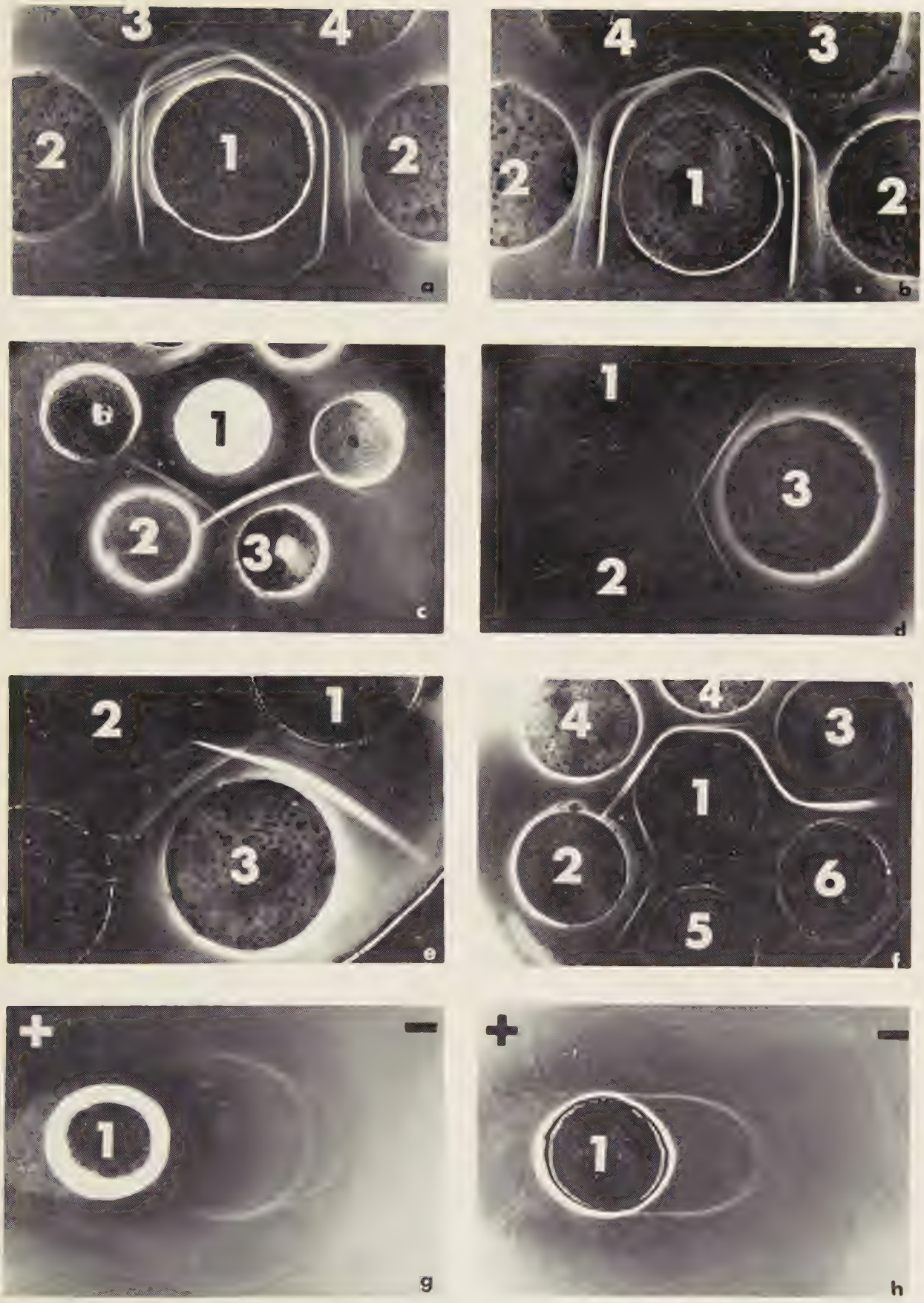


PLANCHE III

TABLEAU XVI : Thermosensibilité des précipitogènes G et C.

Le nombre de croix est proportionnel à la quantité de précipitogène présent.

Antigène	Temps de chauffage à +50°C			
	0	15 mn	30 mn	60 mn
G	++++	++	+	+
C	++++	++	+	-

b) Comportement des précipitogènes G et C vis-à-vis du pH (pendant 15 mn)

Les résultats figurent dans le tableau XVII. On y constate que le précipitogène C est plus sensible que le précipitogène G vis-à-vis des pH acides et basiques.

TABLEAU XVII : Action du pH sur les précipitogènes G et C.

Le nombre de croix est proportionnel à la quantité de précipitogène présent.

pH	0,5	1	1,5	2	2,5	3,8	4,6	5,1 à 9,5	10	11	12
G	-	±	±	+	+	+	++	++	++	+	-
C	-	-	-	+	+	+	+	++	+	-	-

c) Electrophorèse

Les précipitogènes G et C ont été soumis à l'action du courant dans un gel contenant ou non un sérum anti.

- En milieu gélosé contenant des anticorps

Cette technique a été réalisée en gélose ou en agarose et différents paramètres ont été modifiés : concentration respective du sérum anti C et du sérum anti G dans la gélose, temps de passage du courant, précipitogène utilisé... Des aspects obtenus se trouvent sur la planche III figure 4 et sur la planche IV, figures a, b, c et d. On y constate que le précipitogène G et le précipitogène C fournissent un précipité en forme

.../..

PLANCHE IV

Figure a : Electrophorèse des antigènes G et C dans de l'agarose contenant 15 p. cent de sérum positif de référence Alfort (temps de passage du courant : 90 minutes). 1 : Antigènes G et C.

Figure b : Electrophorèse des antigènes G et C dans de la gélose contenant 15 p. cent de sérum positif de référence Alfort (temps de passage du courant : 90 minutes). 1 : Antigènes G et C.

Figure c : Electrophorèse de l'antigène G dans un gel contenant 10 p. cent de sérum positif de référence Alfort (temps de passage du courant : 90 minutes). 1 : Antigène G.

Figure d : Electrophorèse de l'antigène G dans un gel contenant 20 p. cent de sérum positif de référence Alfort (temps de passage du courant : 3 heures). 1 : Antigène G. Comparer le déplacement de l'antigène avec celui de la figure c.

Figure e : Immunoélectrophorèse en gel d'agar (temps de passage du courant : 90 minutes). 1 : Antigène G d'origine splénique ; 2 : Antigène G préparé à partir de culture cellulaire ; 3 : Sérum positif de référence Alfort.

Figure f : Immunoélectrophorèse simultanée d'antigène G et de sérum anti G (temps de passage du courant : 90 minutes). 1 : Antigène G ; 2 : Sérum anti G.

Figure g : Immunoélectrophorèse en gel d'agar (temps de passage du courant : 80 minutes). 1 : Antigènes G et C ; 2 : Sérum anti C ; 3 : Sérum anti G.

Figure h : Immunoélectrophorèse en gel d'agar (temps de passage du courant : 80 minutes). 1 : Antigènes G et C ; 2 : Sérum anti C ; 3 : Sérum anti G et anti C.

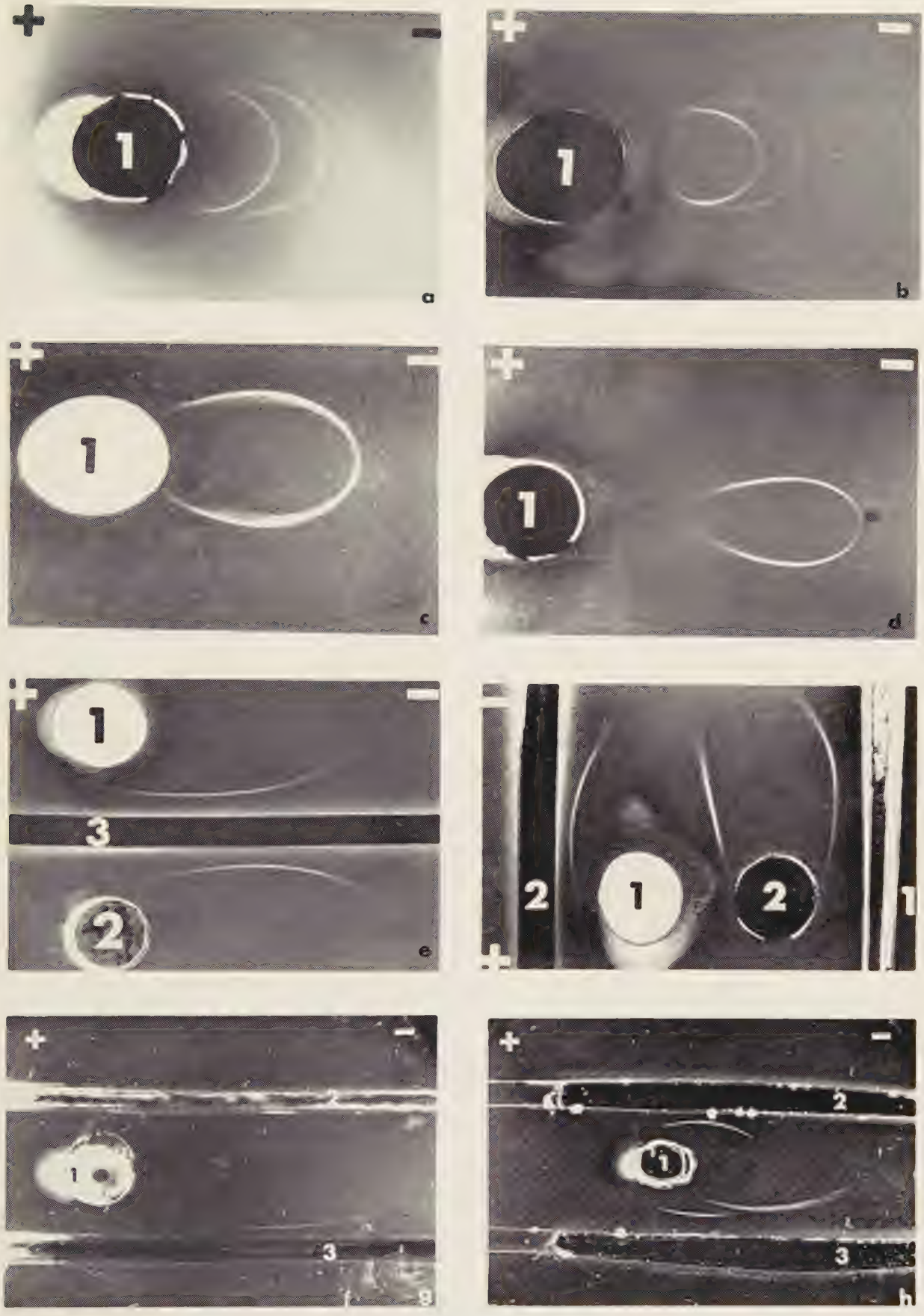


PLANCHE IV

de courbes presque complètement fermées, dont la distance par rapport au dépot est fonction du temps de passage du courant, de la concentration en précipitines et en précipitogène.

L'absence de communauté antigénique entre G et C est illustrée sur la figure g planche III où l'on constate le croisement entre les précipités formés par les deux antigènes.

- Immunoélectrophorèse

Les précipitogènes G et C d'origine cellulaire ou splénique ont été étudiés par immunoélectrophorèse en agar ou en agarose.

Des aspects obtenus sont présentés sur la planche IV (figures e à h).

Les précipitogènes G et C migrent davantage en agar qu'en agarose.

Le précipitogène G d'origine splénique a le même comportement que le précipitogène G d'origine cellulaire (figure e, planche IV).

Le précipitogène G se déplace moins vers la cathode que ne le font les précipitines correspondantes (figure f, planche IV).

Dans nos conditions techniques, le précipitogène C migre davantage vers l'anode que le précipitogène G (figures g et h, planche IV).

3) Caractéristiques physicochimiques des précipitogènes G et C

Les principales caractéristiques physicochimiques des précipitogènes G et C ont été déterminées et sont rassemblées dans le tableau XVIII.
La figure 26 b représente la position des antigènes G et C après centrifugation dans un gradient de saccharose.

TABLEAU XVIII : Caractéristiques des précipitogènes G et C.

	Précipitogène G	Précipitogène C
Poids moléculaire	27.500 ± 20 p. cent	20.000 ± 20 p. cent
Densité apparente en chlorure de césium	1,29 ± 2 p. cent	1,29 ± 2 p. cent
Coefficient de sédimentation	2,4 S ± 5 p. cent	1,7 S ± 5 p. cent

Le précipitogène C est donc une molécule plus petite et plus labile que le précipitogène G.

.../..

II - ETUDE DES PRECIPITINES ANTI AIE

Nous avons étudié l'évolution des anticorps précipitants (délai d'apparition, fluctuations) chez des équidés infectés par le virus AIE dans des conditions naturelles ou expérimentales, ou ayant reçu des injections de précipitogènes G et C.

Par ailleurs, les classes des précipitines anti G et anti C ont été déterminées.

Enfin, l'évolution des précipitines a été comparée à celle des anticorps révélés par immunofluorescence indirecte et aux modifications du protéinogramme sérique.

Nous rendrons compte des résultats dans cet ordre.

A/ Etude cinétique des précipitines

1) Après infection expérimentale

. Les figures 27 à 36 donnent des exemples d'évolution des précipitines anti G et anti C chez des équidés infectés dans des conditions expérimentales. Pour chaque animal, est représentée l'évolution de la température, de l'anémie, du nombre de sidéroleucocytes pour 100.000 leucocytes et des titres des précipitines.

Sur ces figures, on peut constater que les précipitines anti G apparaissent toujours les premières, à une date variable après l'inoculation, en fonction de la dose et de la virulence de la souche virale (délais extrêmes : au 11ème jour pour Bienvenue, au 57ème jour pour Leticia : tableau XIX).

. Les précipitines anti C apparaissent, en général, quelques jours plus tard et restent à un niveau inférieur à celui des anticorps anti G (tableau XIX). Rarement, les précipitines anti C apparaissent en même temps que les précipitines anti G (Siamato, figure 34). Le plus souvent, la différence est de quelques jours (figure 37), parfois de plusieurs semaines (Retzquilleur, Tinamite, Eden). Pour le poney Leticia, seuls les anticorps anti G ont été décelés, jusqu'au moment de la mort, 216 jours après l'infection (figure 32).

Pour une même souche (Alfort Arlette), le délai séparant l'apparition des précipitines anti G et anti C peut varier, sans doute en fonction de plusieurs facteurs : dose d'inoculum, sensibilité individuelle...

Chez la jument Arlette, infectée par l'AIE dans les conditions naturelles

.../..

TABLEAU XIX : Dates d'apparition des précipitines après l'infection expérimentale par virus AIE.

Equidés	Modalités d'inoculation	Délai d'apparition des précipitines anti G	Délai d'apparition des précipitines anti C	Observations
Noiraud	0,1 ml de sérum (souche Wyoming)	18 jours	21 jours	Mort, au jour 25 (huit jours à plus de 40°C)
Tétu	0,1 ml de sérum(souche Wyoming)	18 jours	21 jours	Evolution bénigne (température maximale 39°5C)
Vril	0,01 ml de sérum (souche Alfort Avril) au jour 0 puis 0,5 ml de sérum (souche Wyoming) au jour 193	42 jours	61 jours	Mort, 32 jours après l'inoculation de la souche Wyoming
Retzquilleur	0,01 ml de sérum (souche Alfort Retz) au jour 0 puis 0,5 ml de sérum (souche Wyoming) au jour 196	35 jours	65 jours	Mort, 31 jours après l'inoculation de la souche Wyoming
Leticia	0,01 ml de sérum (souche Alfort Arlette) au jour 0 puis 0,5 ml de sérum (souche Wyoming) au jour 193	57 jours	Absentes jusqu'à la mort au jour 216	Mort, 22 jours après l'inoculation de la souche Wyoming
Pasteur	200 ml de sérum (souche Wyoming)	14 jours	21 jours	Cheval destiné à la production de précipitogène. Non sacrifié en raison d'une faible réponse thermique
Dresdémone	0,5 ml de sérum (souche Wyoming)	15 jours	21 jours	Deux crises d'AIE
Sassy	0,5 ml de sérum (souche Wyoming)	15 jours	21 jours	Mort, au 30è jour
Tinamite	10 ml de sérum Arlette	19 jours	71 jours	Plusieurs crises d'AIE
Bienvenue	150 ml de sérum (souche Wyoming)	11 jours	24 jours	Mort, au 25è jour
Eden	1 ml surnageant de culture cellulaire E.D. (souche Wyoming)	28 jours	58 jours	Plusieurs crises d'AIE
Siamato	50 ml de sérum Leticia	35 jours	35 jours	Pas de fièvre

figure 27 : Evolution des précipitines anti G et anti C chez un poney (Noiraud) infecté par 0,1 ml de sérum contenant du virus AIE souche Wyoming.

La flèche indique la date d'inoculation. En abscisse sont mentionnés les jours.

En ordonnée, de bas en haut, sont portés : l'évolution de la température en degré centésigrades, l'évolution des titres (dénominateur de la dilution) des précipitines anti G (trait plein) et anti C (pointillé), le nombre de sidéroleucocytes pour 100.000 leucocytes et le nombre de globules rouges par mm3 exprimé en millions.

Le poney est mort au jour 25 après être resté pendant 8 jours à plus de 40°C.

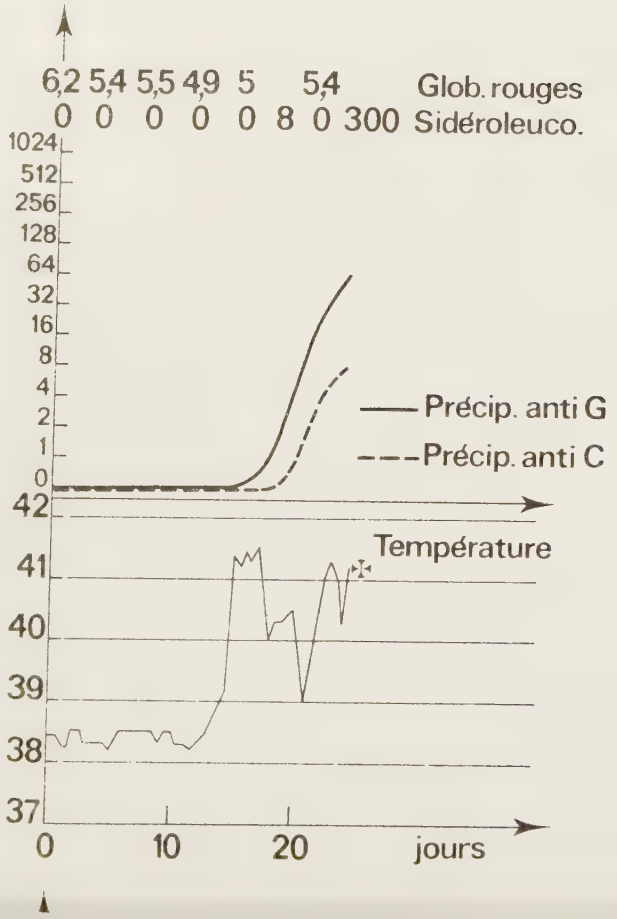


figure 28 : Evolution des précipitines anti G et anti C chez un poney (Sassy) infecté par 0,5 ml de sérum contenant du virus AIE souche Wyoming (Géronimo, septième accès). Même légende que pour la figure 27.

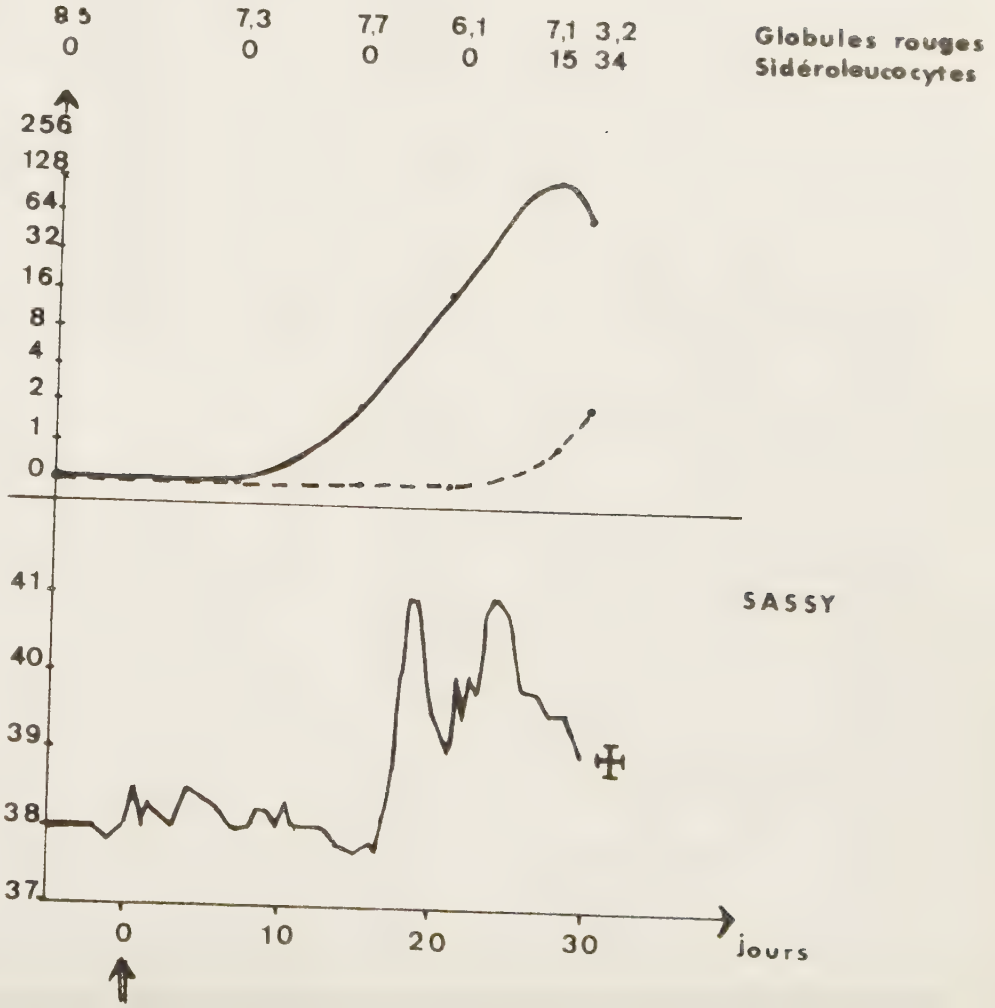


figure 29 : Evolution des précipitines anti G et anti C chez un autre poney (Tétu) infecté par 0,1 ml de sérum contenant du virus AIE souche Wyoming.
Même légende que pour la figure 27.
Le poney n'a présenté qu'une maladie bénigne (aucune température supérieure à 39,5°C) et le taux des précipitines a diminué au cours du temps.

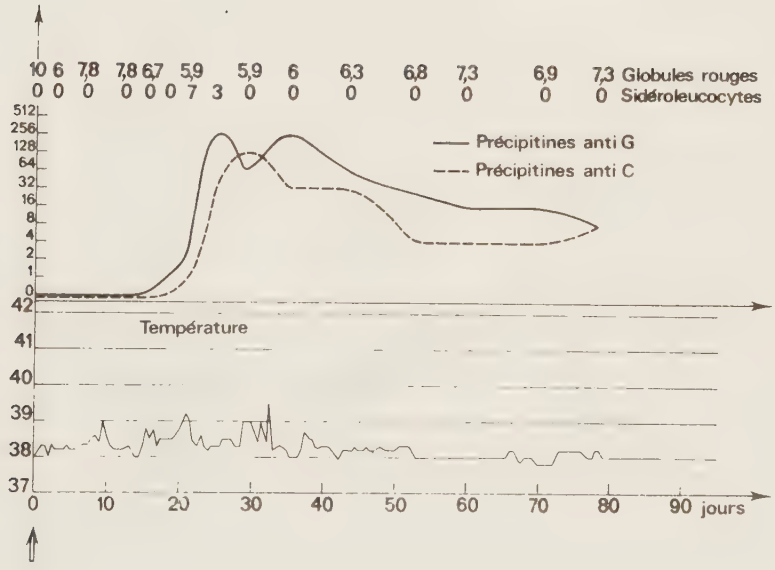


figure 30 : Evolution des précipitines anti G et anti C chez un poney (Dresdémone) infecté par 0,5 ml de sérum contenant du virus AIE souche Wyoming (Géronimo, premier accès).

Même légende que pour la figure 27.

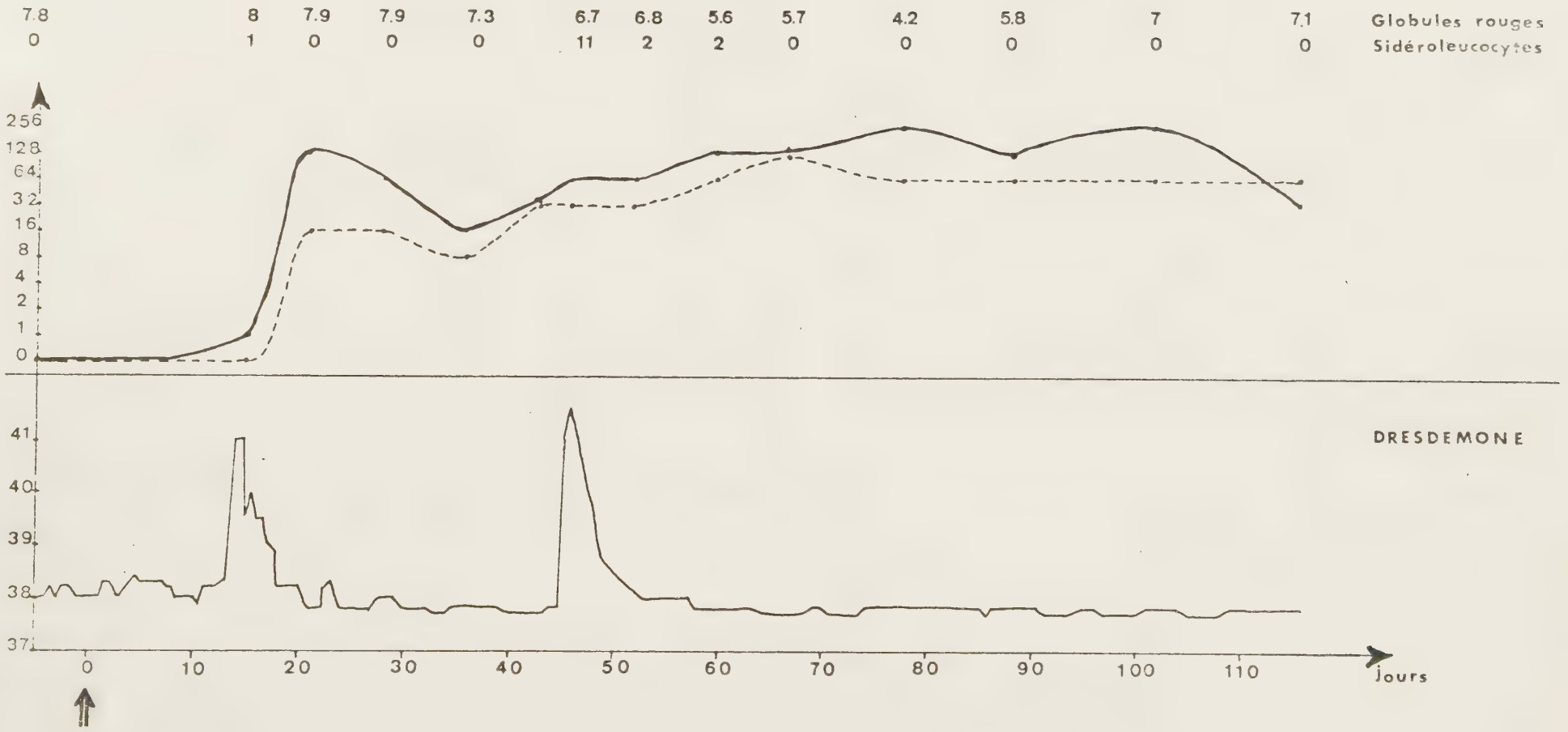


figure 31 : Evolution des précipitines anti G et anti C chez un poney (Eden) infecté par 1 ml de surnageant de culture cellulaire (ED) au 38ème passage de la souche Wyoming.

Même légende que pour la figure 27.

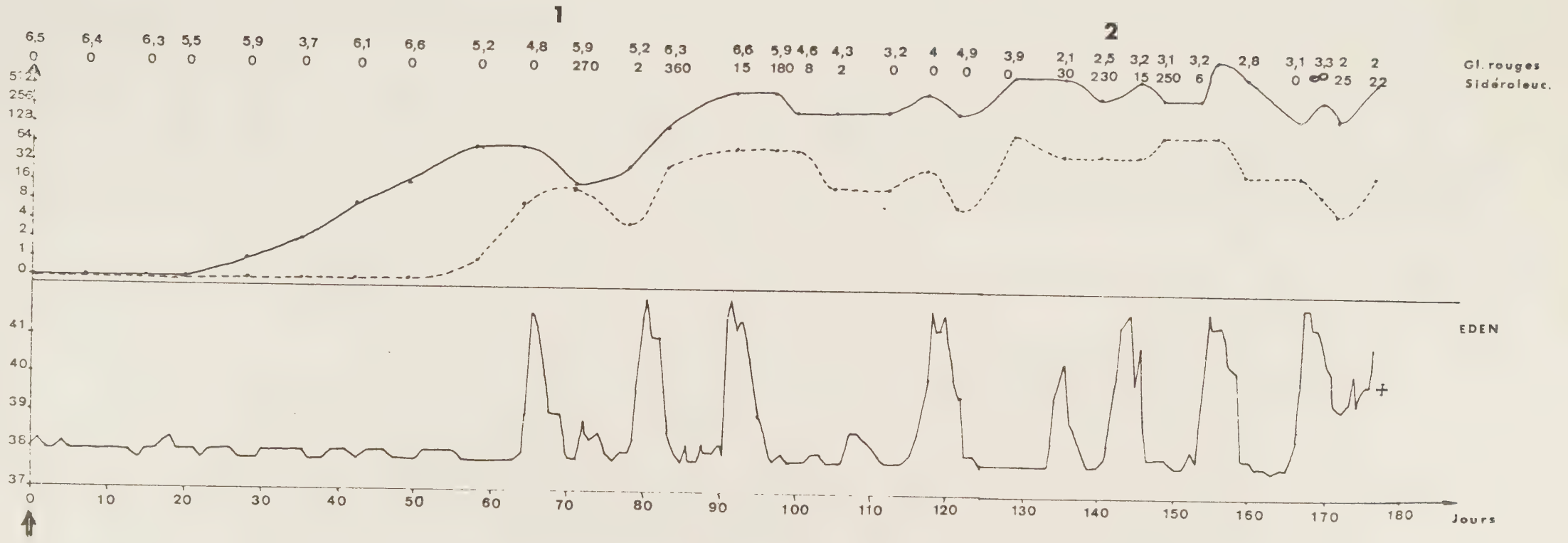


figure 32 : Evolution des précipitines anti G chez un poney (Leticia) infecté, au jour zéro, par 0,01 ml de sérum contenant du virus AIE souche Alfort Arlette, puis au jour 193 par 0,5 ml de sérum souche Wyoming.
Même légende que pour la figure 27.
Les précipitines anti C n'ont pu être décelées jusqu'à la mort qui est survenue au jour 216. De l'antigène C a été trouvé dans la rate et dans le poumon.

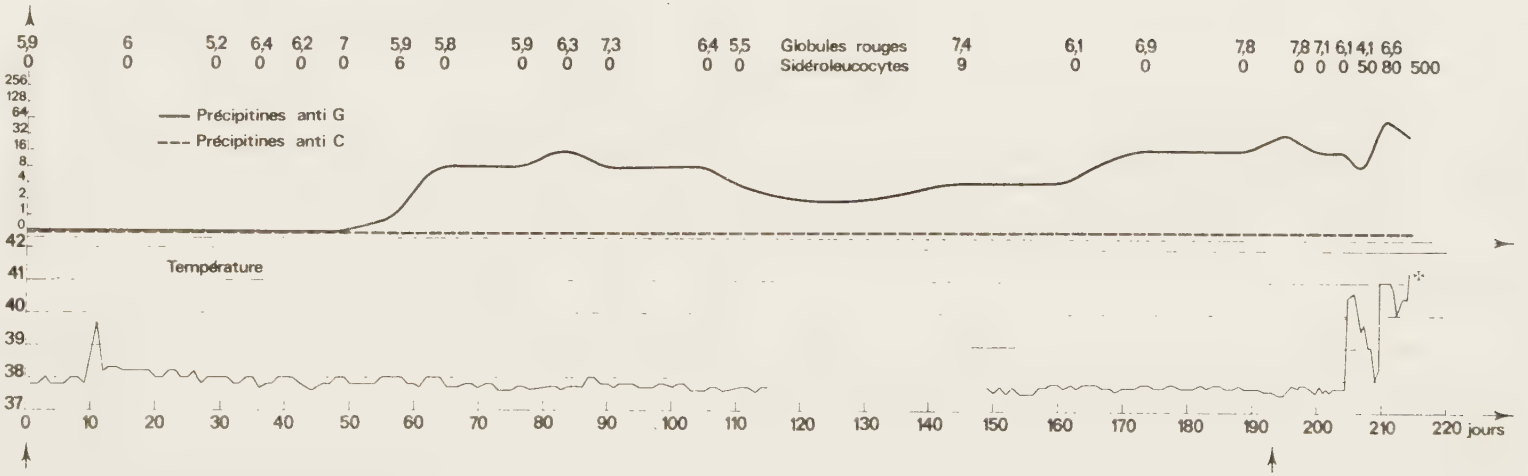


figure 33 : Evolution des précipitines anti G et anti C chez un poney (Tinamite) infecté par 10 ml de sérum contenant du virus AIE souche Alfort Arlette, puis éprouvé au jour 489 par la souche Wyoming. (0,5 ml de sérum Mélanose).

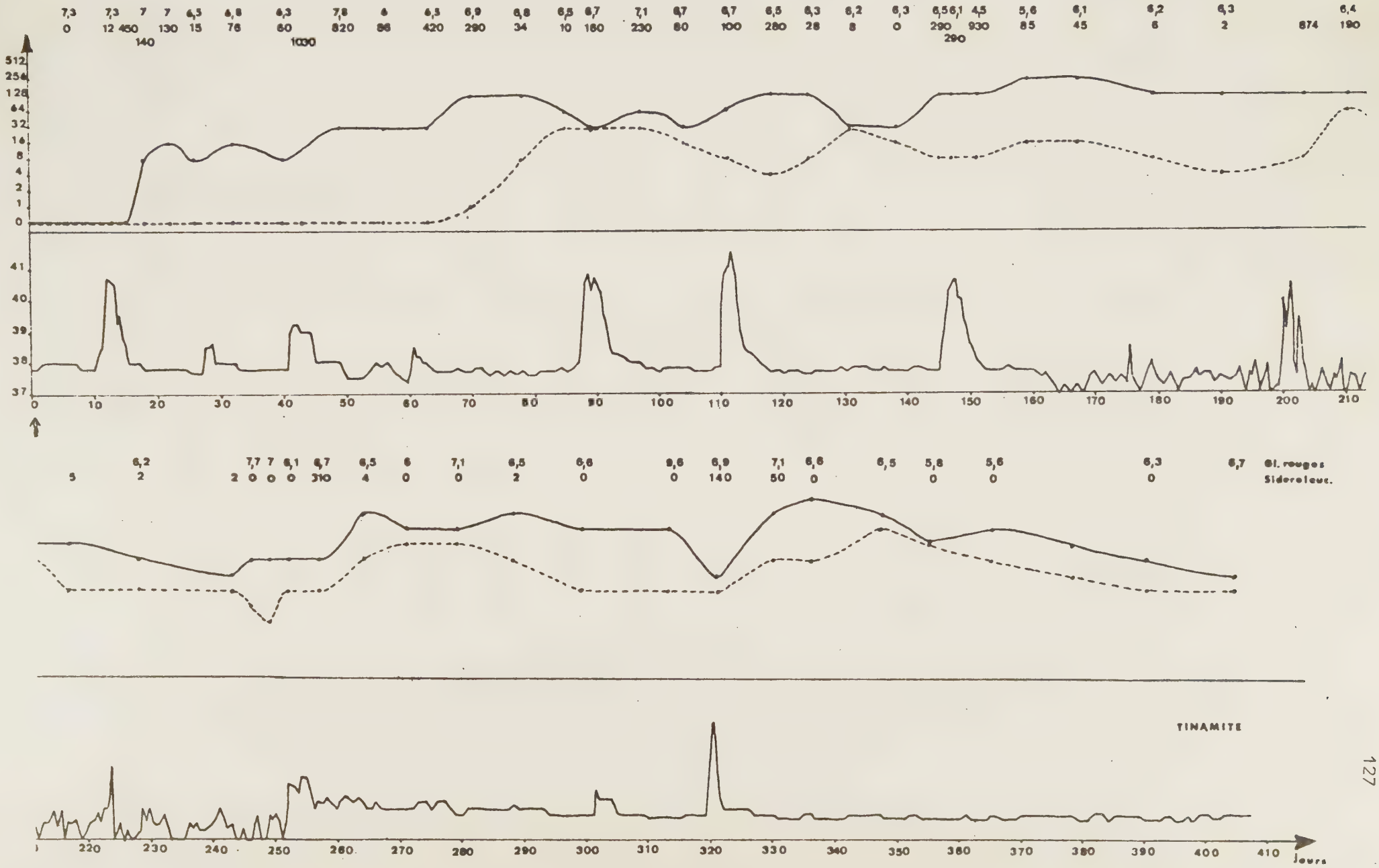
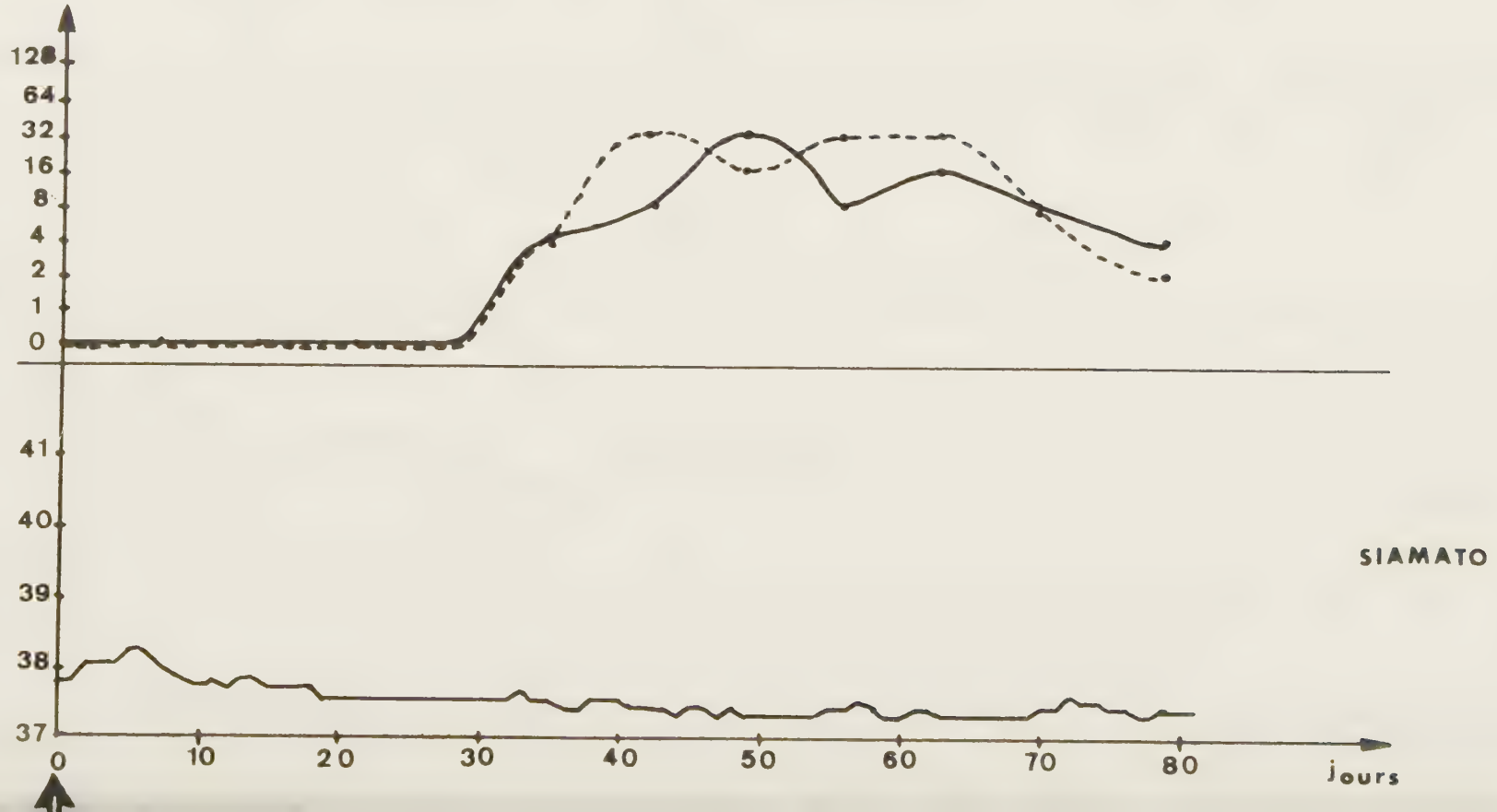


figure 34 : Evolution des précipitines anti G et anti C chez un âne (Siamato) infecté par 50 ml de sérum contenant du virus AIE (poney Leticia).
Même légende que pour la figure 27.

6.5	5.7	5.4	5.7	5	6	5.8	5.7	5.2	5.4	Globules rouges
10	8	0	4	60	90	38	10	0	0	Sidéroleucocytes



de sérum contenant du virus AIE souche Alfort Avril, puis au jour 193 par 0,5 ml de sérum souche Wyoming.
Même légende que pour la figure 27.

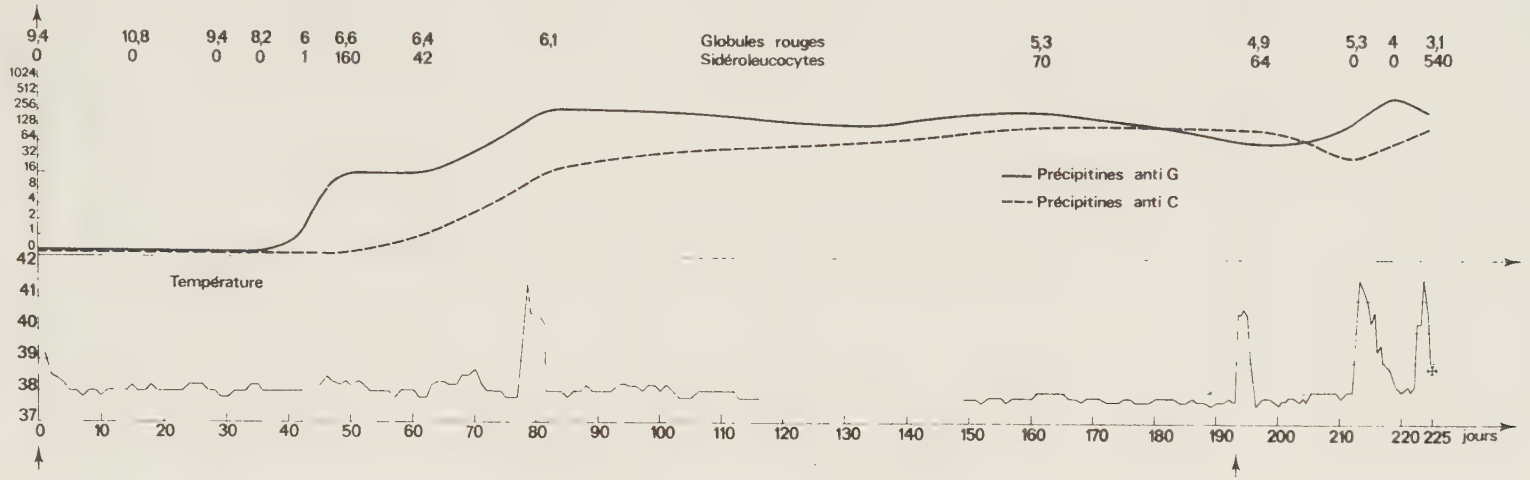


figure 36 : Evolution des précipitines anti G et anti C chez un poney (Retzquilleur) infecté au jour zéro, par 0,01 ml de sérum contenant du virus AIE souche Alfort Retz, puis au jour 196 par 0,5 ml de sérum souche Wyoming.
Même légende que pour la figure 27.

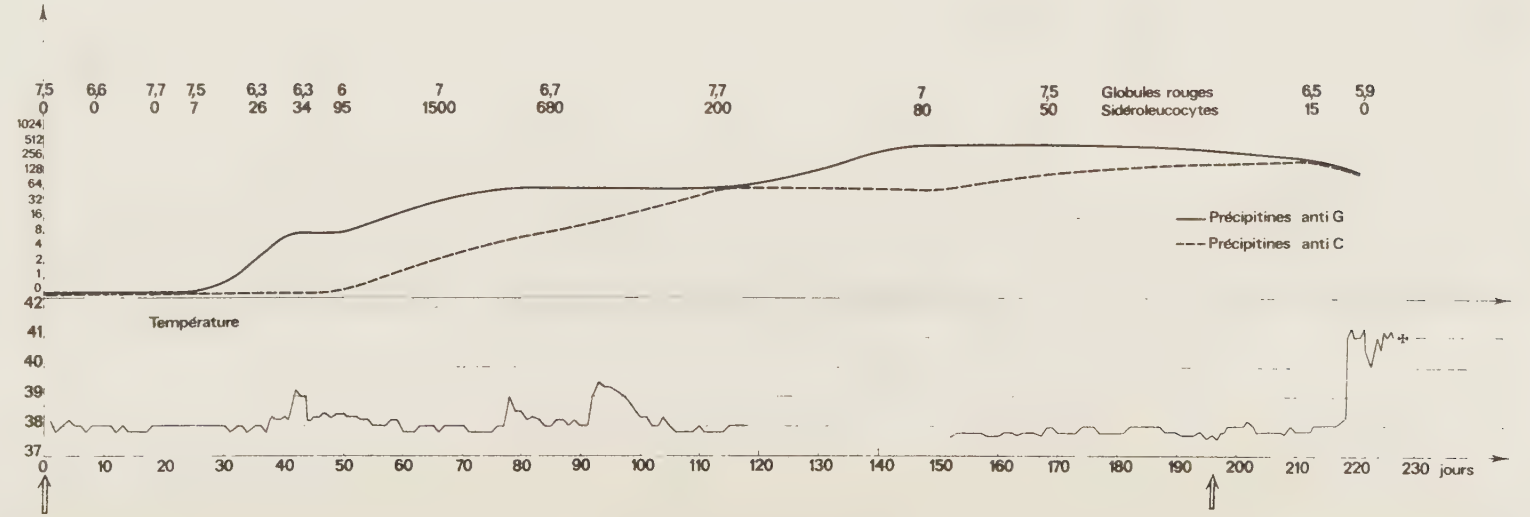
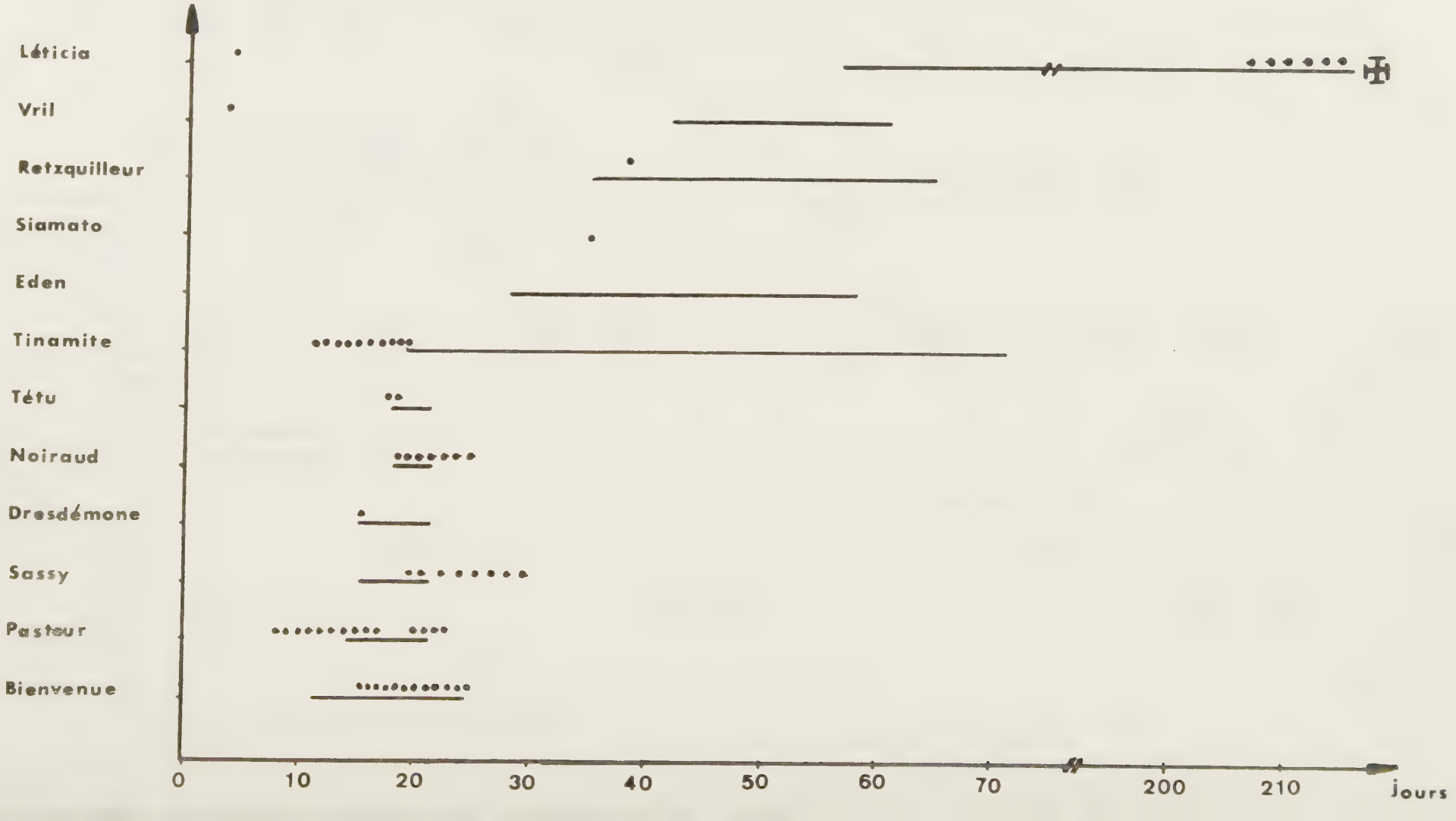


figure 37 : Représentation schématique du délai séparant l'apparition des précipitines anti G de celle des précipitines anti C chez différents équidés infectés par le virus AIE dans des conditions expérimentales. Pour chaque équidé, le début du trait indique la date d'apparition des précipitines anti G, et la fin du trait celle des précipitines anti C. Pour le poney Leticia, il n'a pas été possible de déceler les précipitines anti C. Les points correspondent à la période de fièvre.



les taux de précipitines anti C sont restés très faibles et passagers (figure 38). Les inoculations effectuées à partir du sérum d'Arlette sont résumées ci-dessous.

Sérum Arlette —0,01 ml→ Leticia —50 ml→ Siamato

Leticia : précipitines anti G 57ème jour ; jamais de précipitines anti C

Siamato : précipitines anti G au 35ème jour ; précipitines anti C au 35ème jour

Sérum Arlette —10 ml→ Tinamite

Tinamite : précipitines anti G au 19ème jour ; précipitines anti C au 71ème jour

. Ultérieurement, le taux des précipitines varie selon les équidés et en fonction de la gravité de la maladie. Chez les poneys qui n'ont présenté qu'une brève réaction thermique, les anticorps atteignent des niveaux faibles, puis ont tendance à diminuer (figures 29 et 34). En revanche, chez les équidés ayant fortement réagi sur le plan clinique, les taux d'anticorps sont plus élevés. En général, on note une diminution du taux des précipitines pendant la crise, accompagnée d'une augmentation dans les jours suivants.

2) Après infection naturelle

L'évolution des précipitines anti G et anti C a été suivie chez divers équidés infectés par le virus AIE dans les conditions naturelles et chez des poulains issus de juments infectées.

a) Equidés adultes

Les résultats obtenus chez les équidés contaminés dans les conditions naturelles sont semblables aux précédents à la différence près qu'il n'est pas possible de préciser la date de l'infection.

Un exemple d'évolution est représenté par la figure 39.

La plupart des sérums de chevaux atteints spontanément d'AIE et qui répondent positivement au test diagnostique d'immunodiffusion, possèdent à la fois des précipitines anti G et anti C. Le taux des anticorps anti G est presque toujours supérieur à celui des anticorps anti C et, par suite, la ligne G se forme plus près de la source d'antigène que la ligne C.

.../..

figure 38 : Représentation schématique de l'évolution des taux de précipitines anti G et anti C chez la jument Arlette infectée dans les conditions naturelles par le virus AIE. L'origine du temps a été fixée arbitrairement (jument infectée depuis au moins 2 ans et 6 mois).

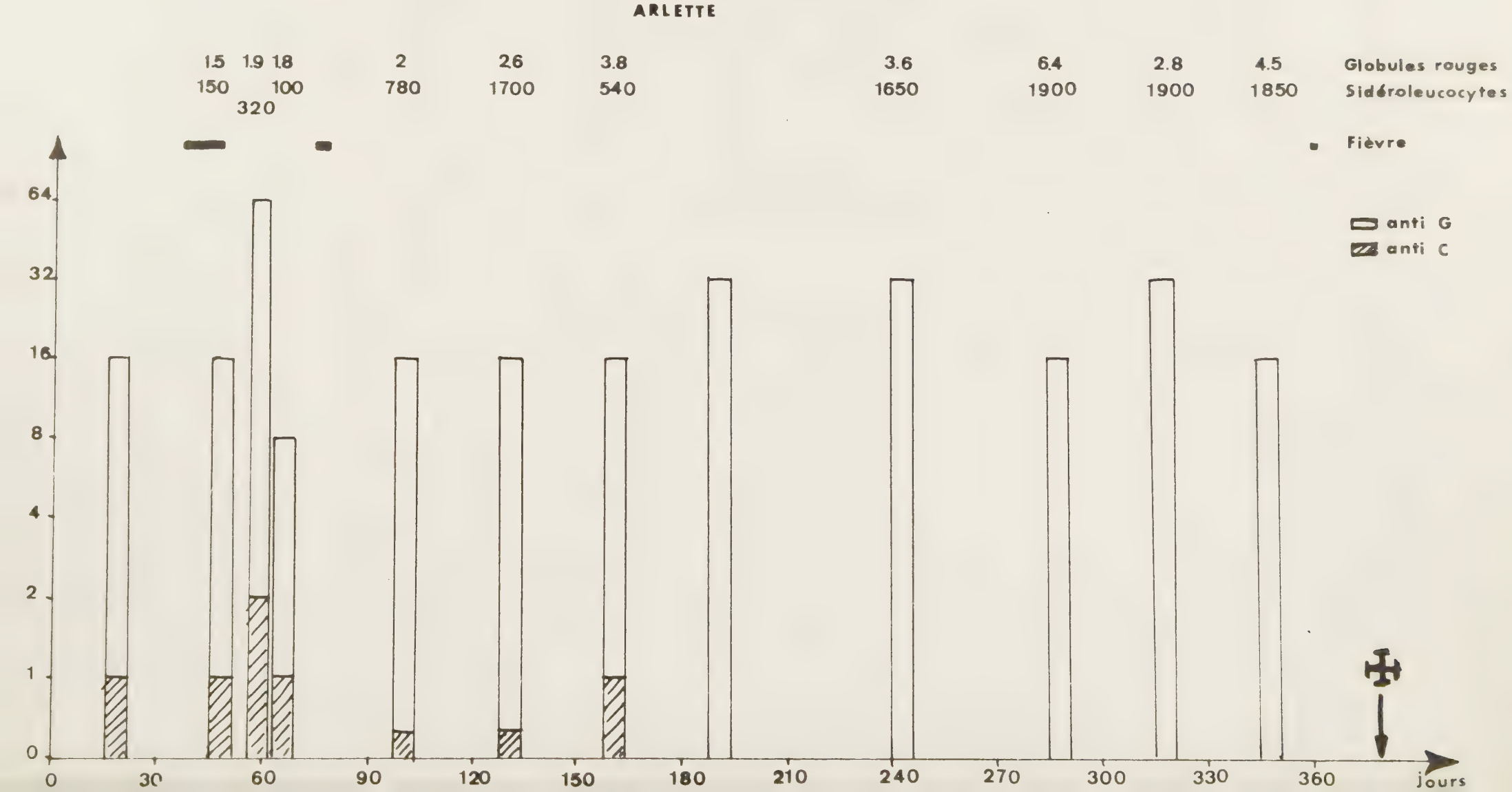
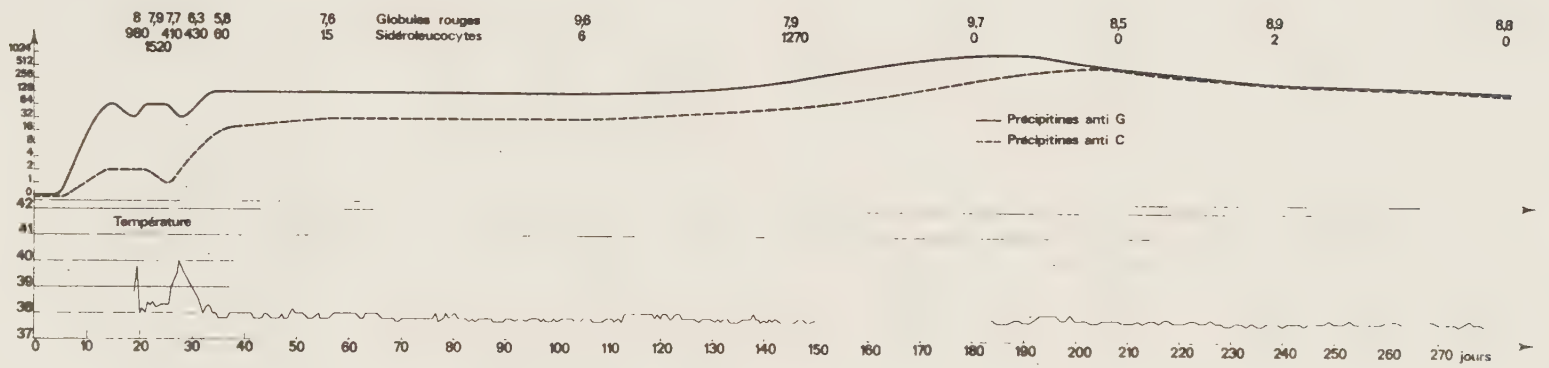


figure 39 : Evolution des précipitines anti G et anti C chez un cheval infecté dans les conditions naturelles (Retz).

Même légende que pour la figure 27. La date exacte d'infection ne peut pas être déterminée.



Avec de très rares sérums de chevaux atteints d'AIE, la ligne C se forme plus près de la source d'antigène que la ligne G.

b) Poulains

Les poulains nés de mères infectées et qui ne sont pas eux-mêmes infectés, éliminent les anticorps d'origine maternelle en un temps variable.

- Le poulain Ipso Facto, né le 27 avril 1972, n'avait dû recevoir qu'une quantité très faible d'anticorps anti AIE, car, à son 48ème jour, il fournissait déjà une réponse négative en immunodiffusion après avoir donné une réponse faiblement positive à son 8ème jour. Sa mère (Eclipse) a sans doute été infectée en fin de gestation, car, 44 jours avant la mise-bas, son sérum donnait encore une réponse négative au test d'immunodiffusion (réponse faiblement positive 6 jours avant la mise-bas).

- La pouliche Letkiss, née le 26 avril 1972, éliminait aussi assez rapidement ses anticorps anti AIE, et, après une réponse positive au 8ème jour, on ne pouvait plus mettre en évidence de précipitines au 49ème jour. Pourtant, dans ce cas-ci, sa mère (Arlette) était infectée depuis plusieurs années (au moins deux ans et 5 mois avant la mise-bas).

- Parfois, la réponse du poulain demeure positive beaucoup plus longtemps, en raison d'une quantité élevée de précipitines présentes dans le colostrum. Le poulain Rock (figure 40) fournissait encore une réponse positive 173 jours après sa naissance. L'évolution des précipitines anti G et anti C chez ce poulain est portée sur la figure 40 qui indique également les taux d'anticorps du sérum de la jument le jour de la mise-bas et du colostrum.

3) Après injection des précipitogènes

Trois poneys ont reçu du précipitogène G selon les modalités décrites antérieurement, et un poney, du précipitogène C. Après plusieurs injections d'antigène, les poneys ont été infectés par la souche Wyoming. L'évolution des précipitines est représentée sur les figures 41 à 45.

On constate sur ces courbes :

. que les taux des anticorps obtenus sont voisins de ceux constatés chez les équidés infectés, mais que les délais d'apparition sont en général plus courts (tableau XX) ;

.../..

figure 40 : Représentation schématique de l'évolution du titre des précipitines anti G et de celui des précipitines anti C chez le poulain Rock.

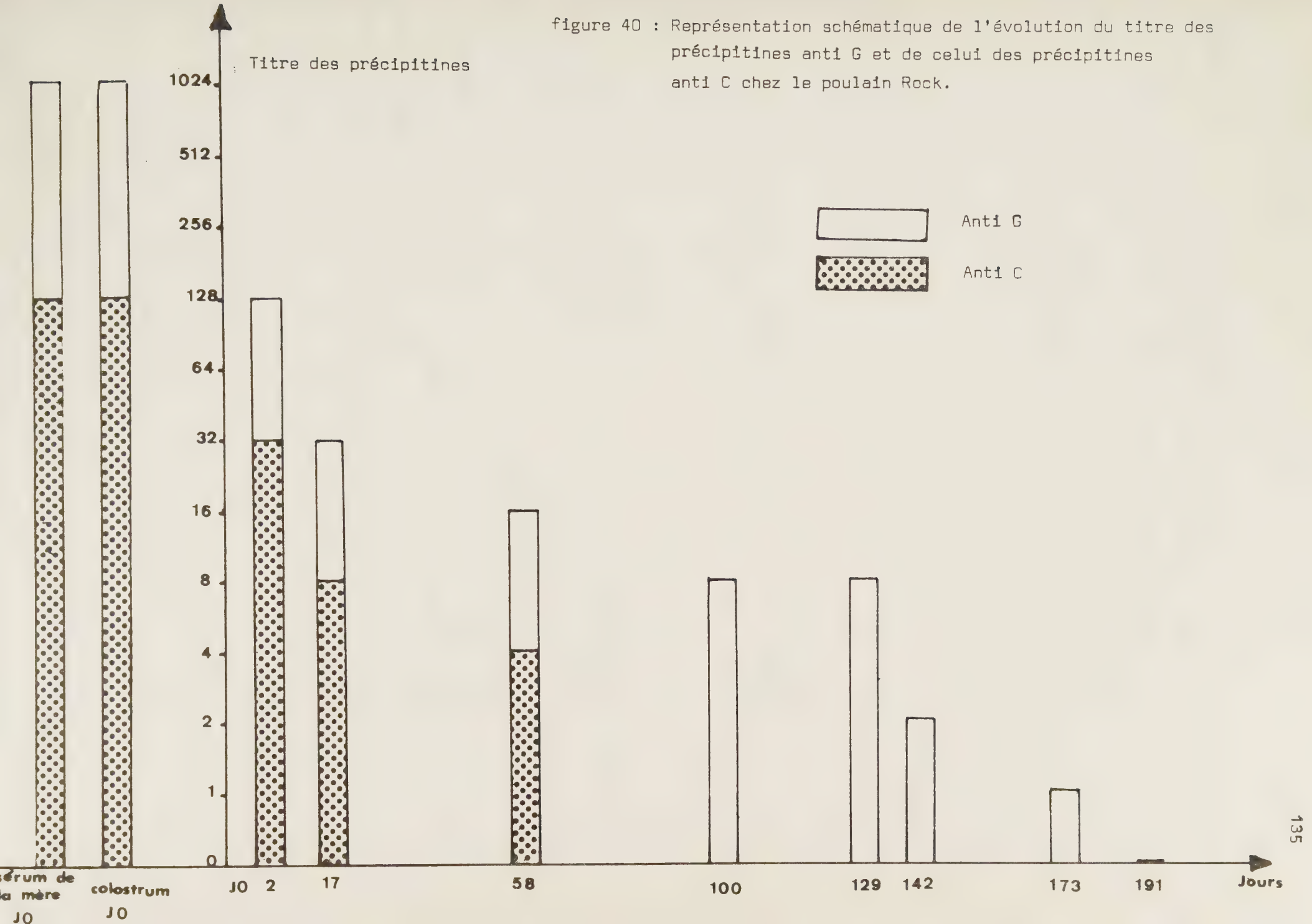


figure 41 : Evolution des précipitines anti G et anti C chez un poney (Poney 9) hyperimmunisé avec l'antigène G (injections aux jours 0, 7, 14, 21, 48 et 80) puis infecté au jour 84 par 1 ml de sérum contenant du virus AIE souche Wyoming.
Même légende que pour la figure 27.
Les précipitines anti C ne sont apparues qu'après l'infection et la mort est survenue le 18ème jour après l'injection du virus AIE.

figure 42 : Evolution des précipitines anti G et anti C chez un poney (Gélose) hyperimmunisé avec l'antigène G (injections aux jours 0, 7, 14, 21 et 43) puis infecté au jour 60 par 0,1 ml de sérum contenant du virus AIE souche Wyoming.
Même légende que pour la figure 27.
Les précipitines anti C n'ont été décelées qu'après l'infection et la mort est survenue 19 jours après l'injection du virus AIE.

figure 43 : Evolution des précipitines anti G et anti C chez un poney (Géronimo) hyperimmunisé avec l'antigène G (injections aux jours 0, 7, 14, 21 et 43) puis infecté au jour 60 par 0,01 ml de sérum contenant du virus AIE souche Wyoming.
Même légende que pour la figure 27.
Des précipitines anti C sont apparues au cours de l'hyperimmunisation avec l'antigène G sans doute à cause de la présence de traces d'antigène C dans la préparation G. Il faut remarquer que le poney Gélose (figure 42) a reçu aux mêmes dates les mêmes préparations antigéniques mais n'a pas produit de précipitines anti C à un taux suffisant pour les déceler avant l'infection.
Un mois après l'épreuve, les taux d'anticorps anti G et anti C ont été très élevés (4096).

figure 41

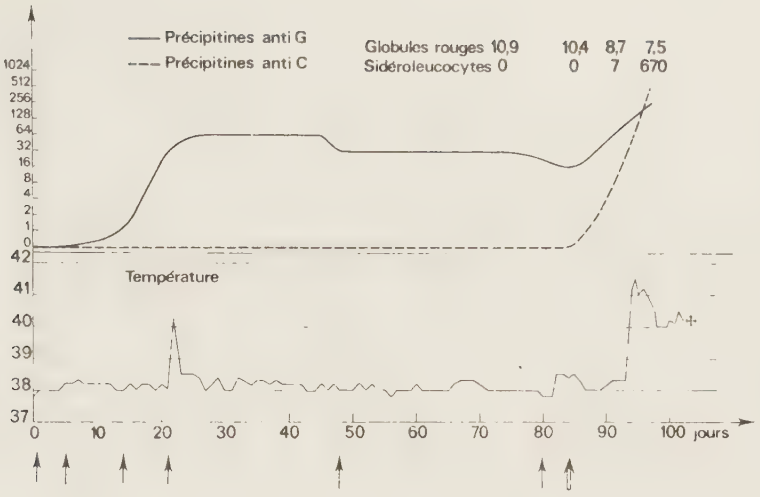


figure 42

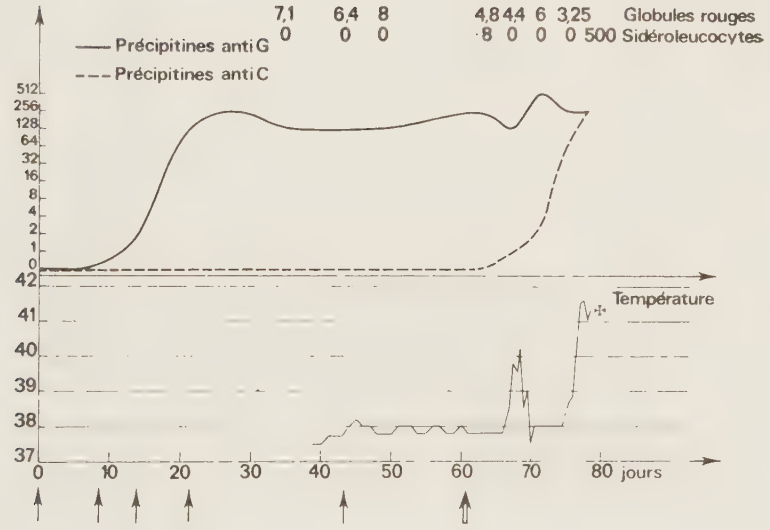


figure 43

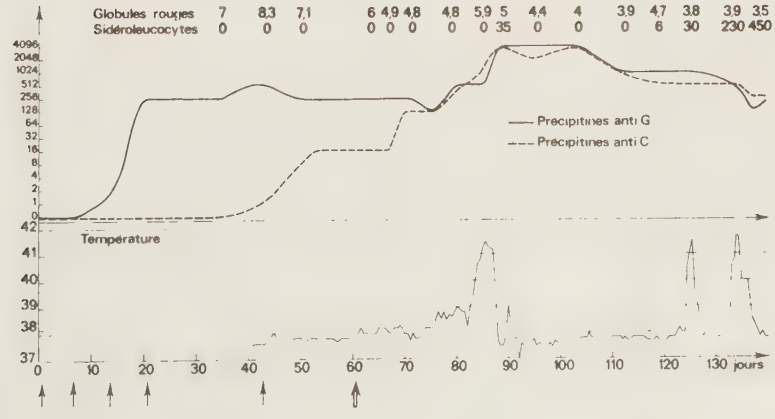


figure 44 : Suite de la figure 43.

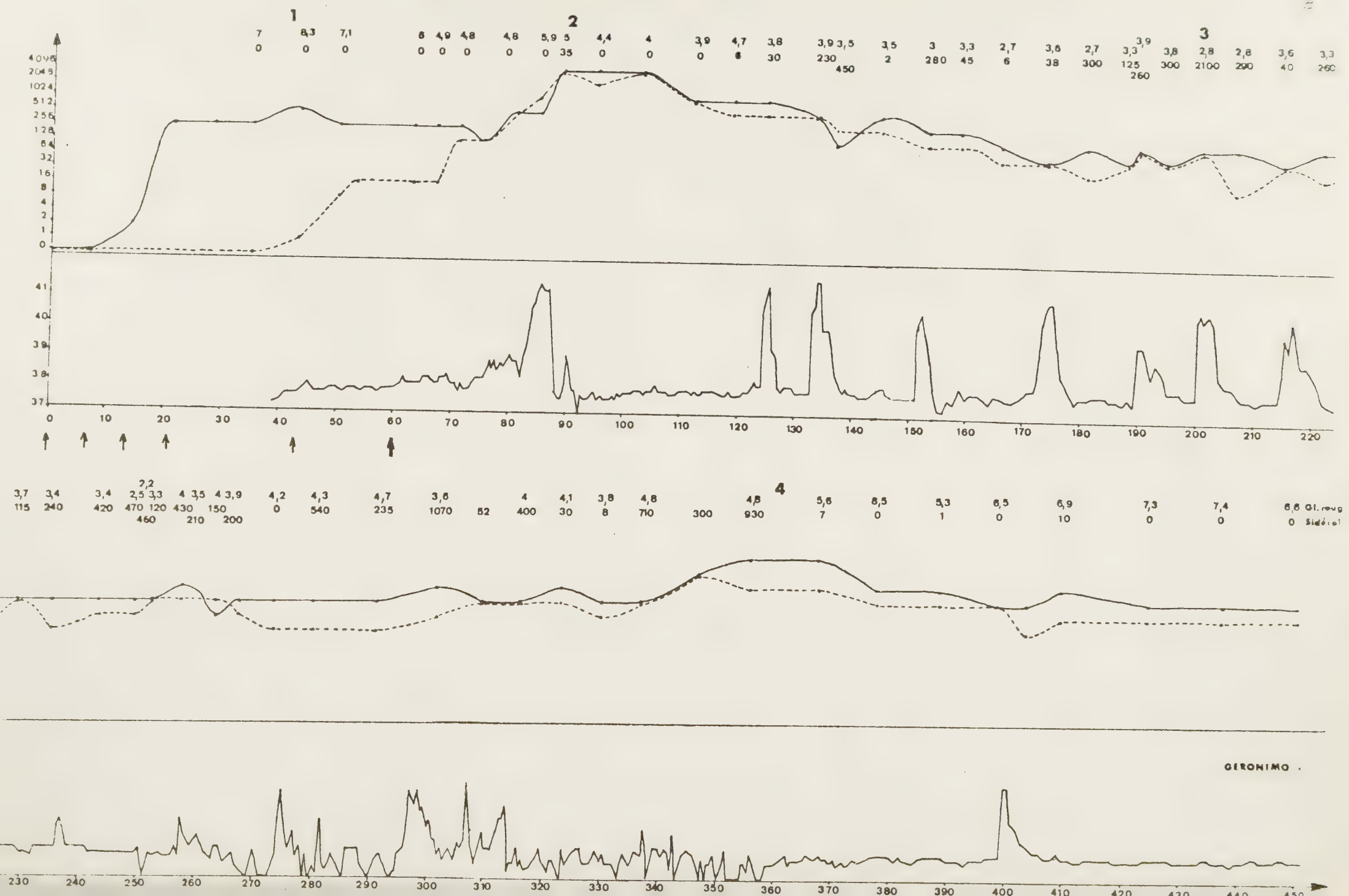


figure 45 : Evolution des précipitines anti G et anti C chez un poney (Bianco) hyperimmunisé avec l'antigène C (injections aux jours 0, 7, 14, 22, 29, 57, 119 et 151) puis infecté au jour 168 par 0,1 ml de sérum contenant du virus AIE souche Wyoming.
Même légende que pour la figure 27.
Les précipitines anti G sont apparues 18 jours après l'épreuve virulente.

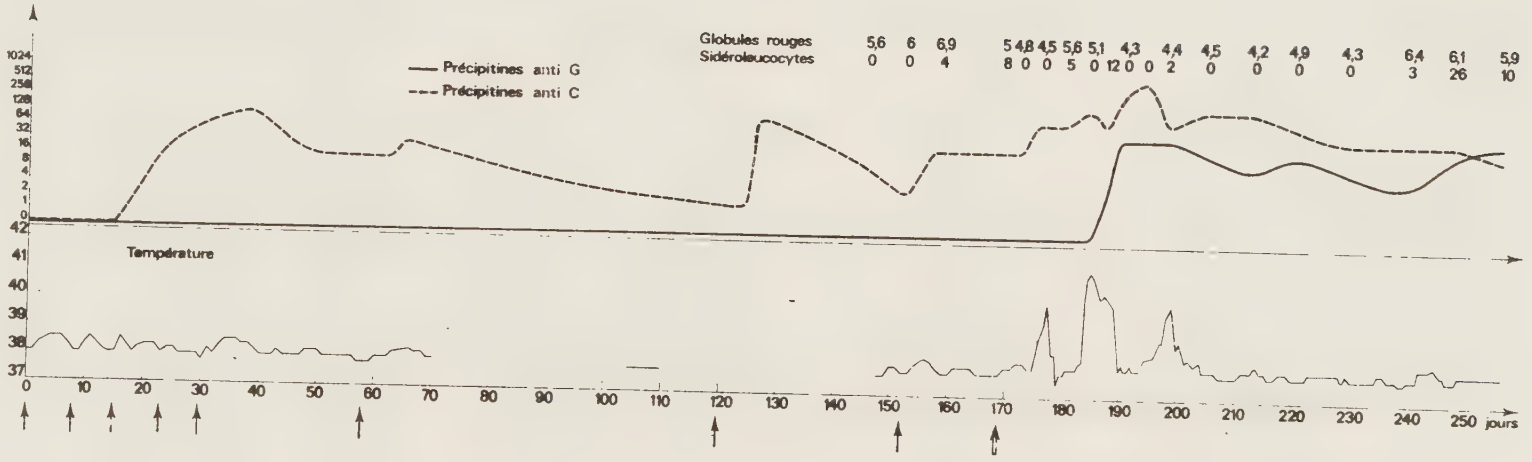


TABLEAU XX : Dates d'apparition des précipitines, après injection des précipitogènes G et C, puis infection par le virus AIE.

Equidés	Modalités d'injection	Délai d'apparition des précipitines anti G	Délai d'apparition des précipitines anti C	Observations
Poney 9	Injections d'antigène G puis inoculation de 1 ml de sérum (souche Wyoming) au jour 84	14 jours	7 jours après l'épreuve virulente	Mort 18 jours après l'épreuve (8 jours à plus de 40°C)
Gélose	Injections d'antigène G puis inoculation de 0,1 ml de sérum (souche Wyoming) au jour 43	14 jours	7 jours après l'épreuve virulente	Mort 19 jours après l'épreuve
Géronimo	Injections d'antigène G puis inoculation de 0,1 ml de sérum (souche Wyoming) au jour 60	14 jours	46 jours	Plusieurs accès après l'épreuve
Bianco	Injections d'antigène C puis inoculation de 0,1 ml de sérum (souche Wyoming) au jour 168	18 jours après l'épreuve virulente	21 jours	Trois accès après l'épreuve

. que, mis à part le poney Géronimo, seuls les anticorps correspondant au précipitogène injecté sont décelables. Il est vraisemblable, cependant, qu'à côté du précipitogène choisi, les préparations antigéniques contenaient des traces de l'autre précipitogène, comme en témoigne la réponse de type secondaire obtenue lors d'épreuve virulente (délai d'apparition réduit à 7 jours) et la présence d'anticorps anti C chez le poney Géronimo n'ayant reçu que des injections d'antigène G.

Il faut d'ailleurs remarquer que le poney Gélose, qui a été immunisé exactement dans les mêmes conditions que Géronimo, ne possédait pas suffisamment de précipitines anti C dans son sérum pour que l'on puisse les déceler avant l'infection.

Après épreuve virulente, le taux des anticorps correspondant à l'hyperimmunisation augmente, tandis qu'apparaissent les précipitines dirigées contre l'autre précipitogène. Ces dernières se maintiennent à un taux inférieur aux autres (sauf chez Bianco).

Chez les chevaux infectés par le virus AIE dans les conditions naturelles ou expérimentales, les précipitines anti G apparaissent plus tôt et atteignent des titres plus élevés que les précipitines anti C. Ultérieurement, on constate des fluctuations, le plus souvent parallèles, des titres des précipitines anti G et anti C, en rapport avec l'évolution de l'infection. Les précipitines anti G demeurent toujours décelables.

4) Relations avec la cinétique des anticorps révélés par immunofluorescence indirecte

Les lamelles portant un tapis de cellules E.D., chroniquement infectées par le virus AIE (souche Wyoming), ont été soumises à l'action de divers sérums d'équidés : sérum anti G, sérum anti C, sérum positif de référence Alfort, sérums d'équidés infectés par le virus AIE et prélevés à différents moments de l'évolution de la maladie.

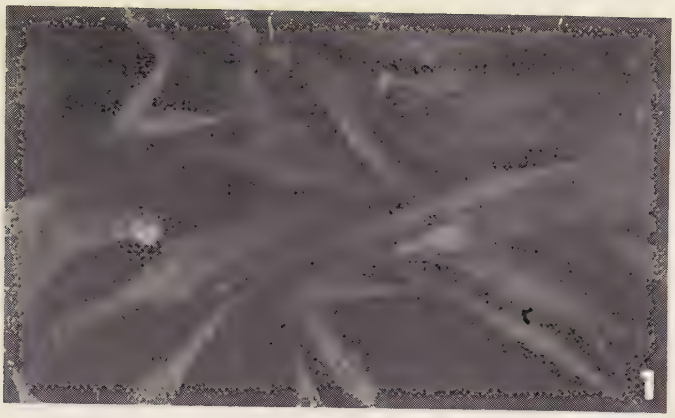
Ces expériences ont permis, d'une part, de préciser la distribution des antigènes AIE dans les cellules infectées, d'autre part, d'étudier les modalités d'apparition et d'évolution des anticorps par cette technique, au cours de l'infection.

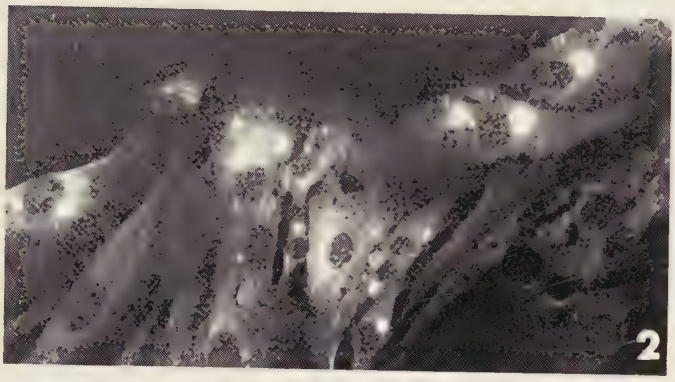
.../..

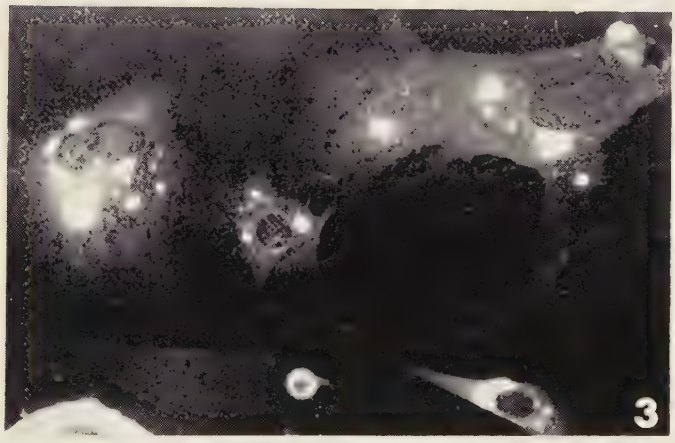
Planche V : Cellules E.D. chroniquement infectées par le virus AIE (souche Wyoming) et traitées par la technique d'immunofluorescence indirecte.

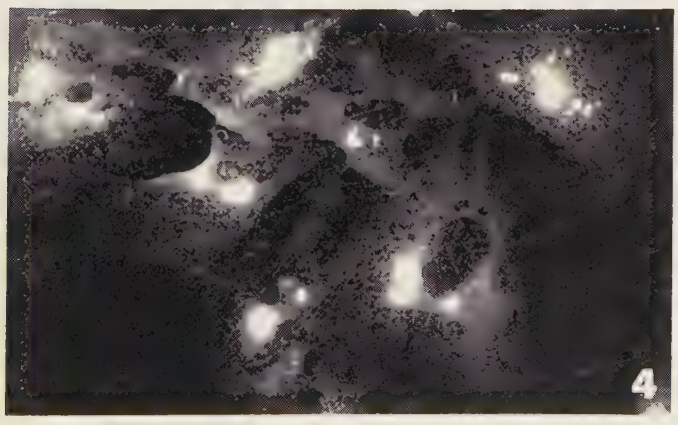
Figure 1 : témoin : cellules infectées, traitées par un sérum dépourvu d'anticorps anti AIE.

Figures 2 à 7 : cellules infectées, traitées par un sérum anti AIE. On constate une distribution de la fluorescence sous forme de granules exclusivement situés dans le cytoplasme des cellules. Ces granules sont souvent disposés tout près du noyau, le long de la membrane nucléaire (figures 5 et 7 en particulier).









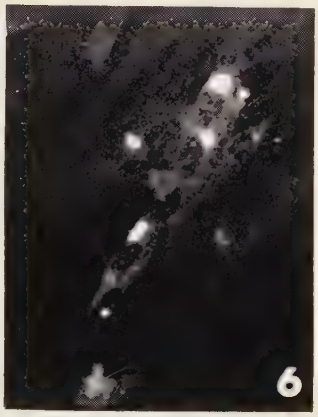


PLANCHE V

a) Antigènes AIE révélables par l'immunofluorescence

Des expériences préliminaires ont montré qu'une bonne production d'antigènes révélés par l'immunofluorescence, était obtenue 2 jours après la mise en culture des cellules E.D. Sur des tapis cellulaires de cet âge, plus de 50 p. cent des cellules contiennent des antigènes AIE. En présence d'un sérum d'équidé indemne d'AIE, on n'observe aucune fluorescence (planche V figure 1).

Le sérum positif de référence Alfort, dilué au 1/5ème, révèle des antigènes présents exclusivement dans le cytoplasme. Aucune fluorescence n'apparait dans le noyau (planches V à VII). La fluorescence se présente, le plus souvent, sous forme de petites masses arrondies ou ovalaires situées de part et d'autre du noyau, dans les cellules allongées que sont les cellules E.D. (planche V, figures 2 et 6). Le nombre de ces zones d'antigènes AIE varie avec les cellules, de une à une dizaine. La fluorescence est parfois directement située contre la membrane nucléaire (planche V, figures 5 et 7). Parfois, la fluorescence apparait plus étalée, plus diffuse, dans une cellule (planche VII, figures 3, 4 et 5).

Les aspects obtenus après usage d'un sérum anti G ou d'un sérum anti C sont semblables à ceux précédemment décrits et résultant de l'action du sérum positif de référence Alfort (à la fois anti G et anti C) (planche VI, figures 3 et 4 et planche VII, figure 2).

Les sérums de divers équidés (Siamato, Retzquilleur, Vril, Leticia, Tétu) infectés par des souches françaises ou par la souche Wyoming fournissent également les mêmes images.

La culture des cellules E.D. chroniquement infectées par le virus AIE, dans un milieu contenant 10 p. cent de sérum anti AIE (sérum d'Eden ou de Géronimo), ne conduit pas à la disparition des antigènes révélables par l'immunofluorescence, même après 4 passages en série dans ces conditions.

b) Anticorps anti AIE révélés par l'immunofluorescence

- Cinétique

Des échantillons de sérums prélevés à divers moments après l'infection d'équidés par le virus AIE (souche française et souche Wyoming), ont été étudiés en immunofluorescence.

.../..

Planche VI : Cellules E.D. chroniquement infectées par le virus AIE (souche Wyoming) et traitées par la technique d'immunofluorescence indirecte.

Figure 1 : La fluorescence a tendance à envahir le cytoplasme, en particulier des cellules arrondies.

Figure 2 : Distribution de la fluorescence sous forme de granules pour certaines cellules et de poussière pour d'autres.

Figure 3 : Cellules traitées par un sérum monovalent anti C. L'aspect de la fluorescence est tout à fait comparable à ce que l'on observe sur des cellules traitées par un sérum anti G (figure 4).

Figure 5 : Aspect du tapis de cellules à faible grossissement.

Figure 6 : Accumulation d'antigène AIE dans le cytoplasme d'une cellule.

Figure 7 : Distribution paranucléaire ou périnucléaire des antigènes AIE.

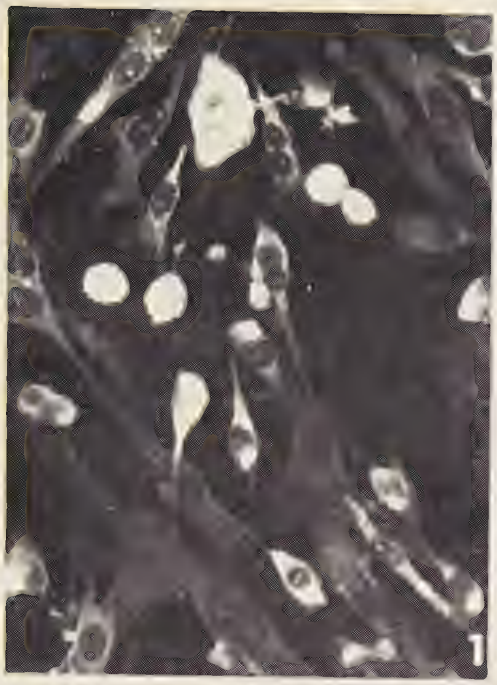


PLANCHE VI

Les résultats de la recherche d'anticorps anti AIE révélables par cette technique sont rassemblés dans le tableau XXI. Dans ce tableau, a été mentionnée également la réponse des sérums en immunodiffusion en gélose vis-à-vis des antigènes G et C.

D'une façon générale, pour les différents équidés infectés par des souches françaises, on constate un bon parallélisme dans l'apparition des anticorps révélés par l'immunodiffusion en gélose et par l'immunofluorescence, avec parfois un léger retard pour cette dernière.

- Nature

Les fractions obtenues lors de chromatographie de sérum ou de colostrum provenant d'équidés infectés par le virus AIE ont été étudiées par la technique d'immunofluorescence indirecte.

On constate un parallélisme étroit entre l'activité précipitante anti G des différentes fractions des sérums et leur activité en immunofluorescence indirecte.

Des essais ont également été réalisés pour comparer les résultats obtenus par les techniques d'immunodiffusion en gélose et d'immunofluorescence indirecte, sur des sérums anti AIE soumis à une absorption préalable par les antigènes AIE. Ont été choisis : un sérum anti G et le sérum du poney Eden. Après absorption du sérum anti G par de l'antigène G et du sérum du poney Eden par les antigènes G et C, la présence des précipitines n'est plus décelable. Ces sérums fournissent alors, également, une réponse négative en immunofluorescence indirecte.

Les anticorps révélables par immunofluorescence indirecte chez les chevaux infectés par le virus AIE ont une évolution comparable à celle des précipitines anti G.

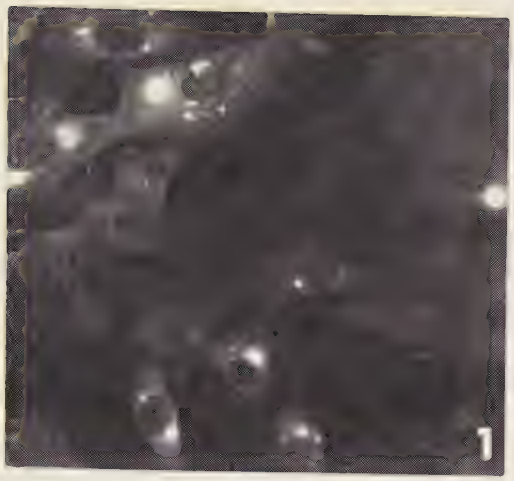
.../..

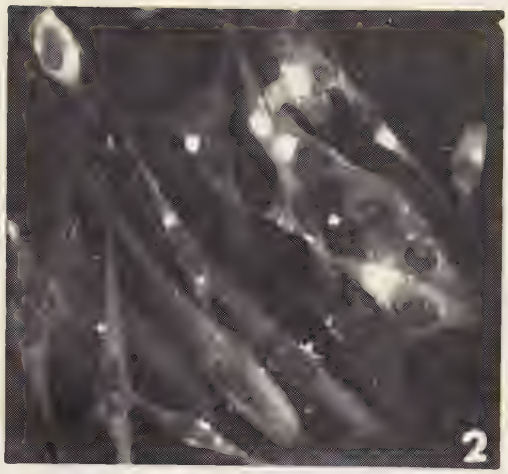
Planche VII : Cellules E.D. chroniquement infectées par le virus de l'AIE (souche Wyoming) et traitées par la technique d'immuno-fluorescence indirecte.

Pour les cellules de la figure 2 on a utilisé un sérum monovalent anti précipitogène C, et pour les autres cellules, le sérum positif de référence Alfort, à la fois anti G et anti C.

On ne constate pas de différence dans la localisation de la fluorescence spécifique après traitement par le sérum anti C ou le sérum anti G et anti C.

Les figures 3, 4, 5 et 6 montrent des grandes cellules présentant une fluorescence, sous forme de granules ou de poussière, largement distribuée dans le cytoplasme.





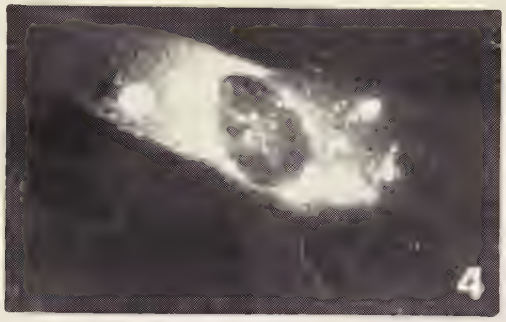


PLANCHE VII

ABLEAU XXI : Résultats de la recherche comparée des anticorps anti AIE par la technique d'immunodiffusion en gélose et par la technique d'immunofluorescence indirecte sur des sérums d'équidés infectés expérimentalement par des souches de virus AIE. Pour chaque équidé, la première ligne correspond aux résultats de l'immunodiffusion et la seconde à ceux de l'immunofluorescence.

Nom de l'équidé	Souche de virus	Temps en jours après l'inoculation (10 – 20 – 30 – 40 – 50 – 60 – 70 – 80)
Eden	virus Wyoming adapté aux cellules E.D.	– – – +G +G +G +G +G et C – – – – + + + +
Siamato	souche française Alfort Arlette	– – +G et C – – – +
Retzquilleur	souche française Alfort Retz	– +G – +
Vril	souche française Alfort Avril	– – +G – – +
Leticia	souche française Alfort Arlette	– – +G +G – – + +

5) Relation avec l'évolution des modifications du protéinogramme sérique

Plusieurs centaines d'échantillons de sérums conservés à -20°C et provenant des divers équidés utilisés pour cette étude, ont été soumis à une électrophorèse sur acétate de cellulose. Les résultats seront évoqués, d'une part, sous forme de présentation de l'évolution chez certains équidés, d'autre part, sous forme de synthèse.

a) Etude de cas particuliers

- Equidés infectés récemment (AIE expérimentale)

6 équidés peuvent être retenus comme exemples.

. Noiraud

L'évolution de l'infection de Noiraud par le virus AIE est schématisée sur la figure 46. Le poney est mort le 25ème jour après l'infection et a présenté une forme aiguë d'AIE.

Avant l'infection (jour - 11), le pourcentage des gamma globulines était faible : 17, tandis que les alpha et les bêta globulines étaient en quantité importante : 52 p. cent (figure 46).

Au jour + 18, les précipitines anti G étaient décelées pour la première fois, en l'absence de précipitines anti C, et la proportion des gamma globulines était passée à 25 p. cent. On constate sur la figure 46 que cette augmentation intéresse tout particulièrement des gamma globulines rapides.

.../..

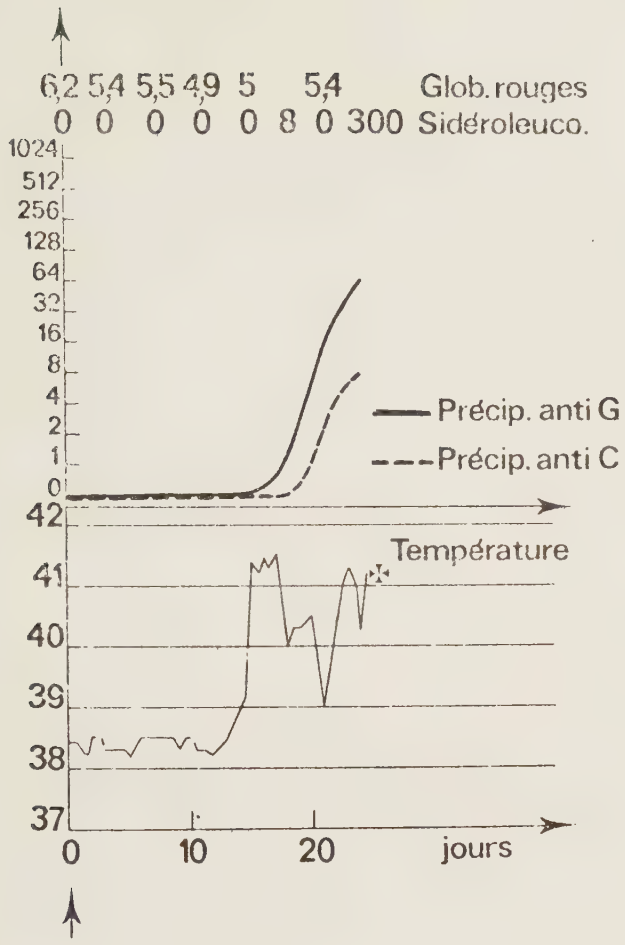
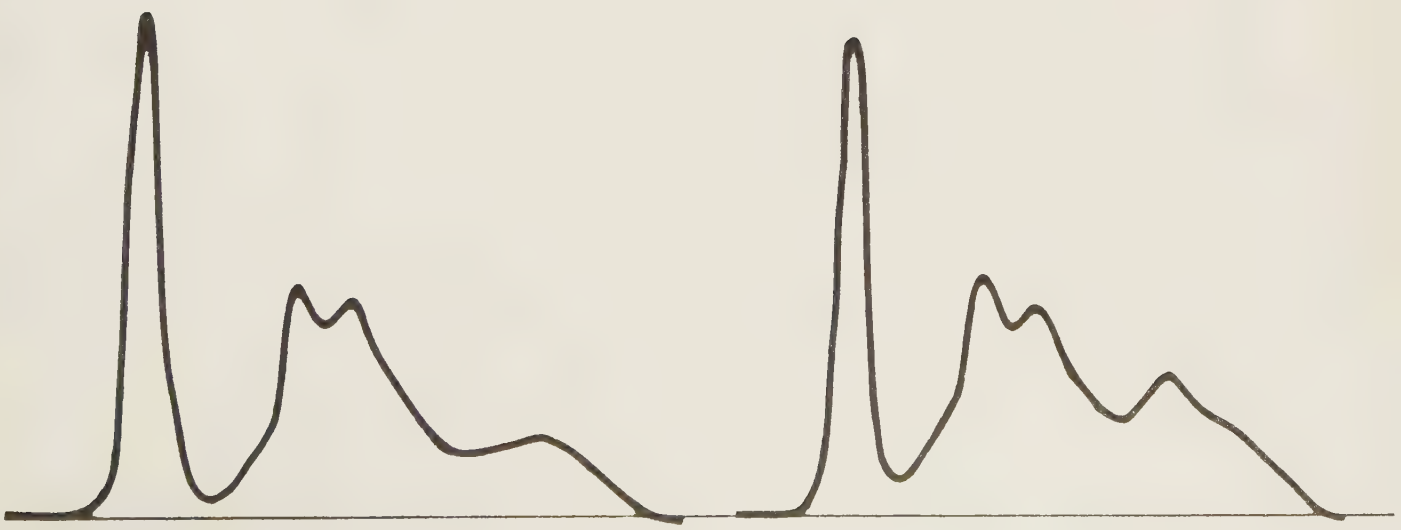


figure 46 : Protéinogrammes du poney Noiraud avant et après infection par le virus AIE .

Date (jours)	-11	+18
% γ globulines	17	25



. Bienvenue

La jument Bienvenue, infectée massivement par 150 ml de sérum virulent, en vue de la production d'antigène, est morte 24 jours après (figure 47). Son pourcentage initial de gamma globulines était élevé : 35, 3 jours avant l'inoculation. 18 jours après celle-ci, et avant l'apparition des précipitines anti C, le pourcentage avait atteint 45, avec un clocher bien marqué dans la zone des gamma globulines rapides.

Le jour de la mort (jour + 24), le pourcentage était encore élevé : 43, mais avec un peu moins de gamma globulines rapides.

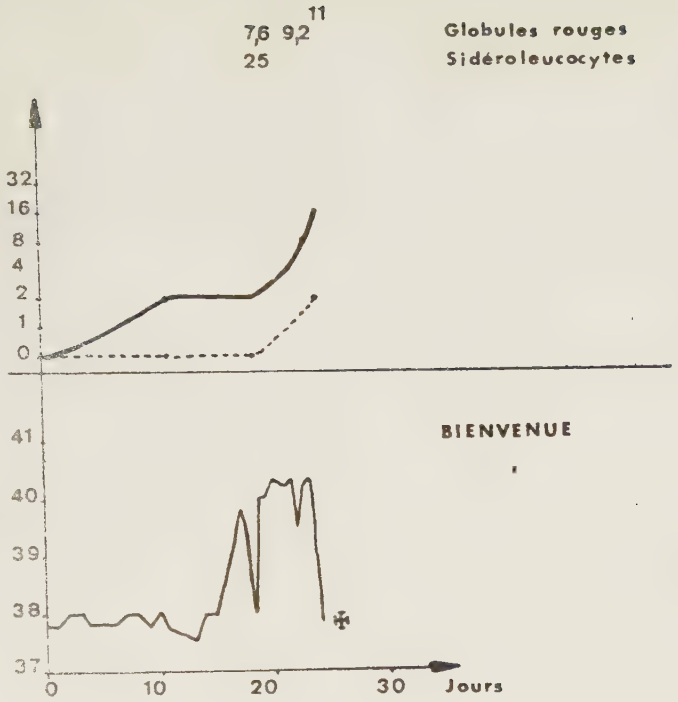
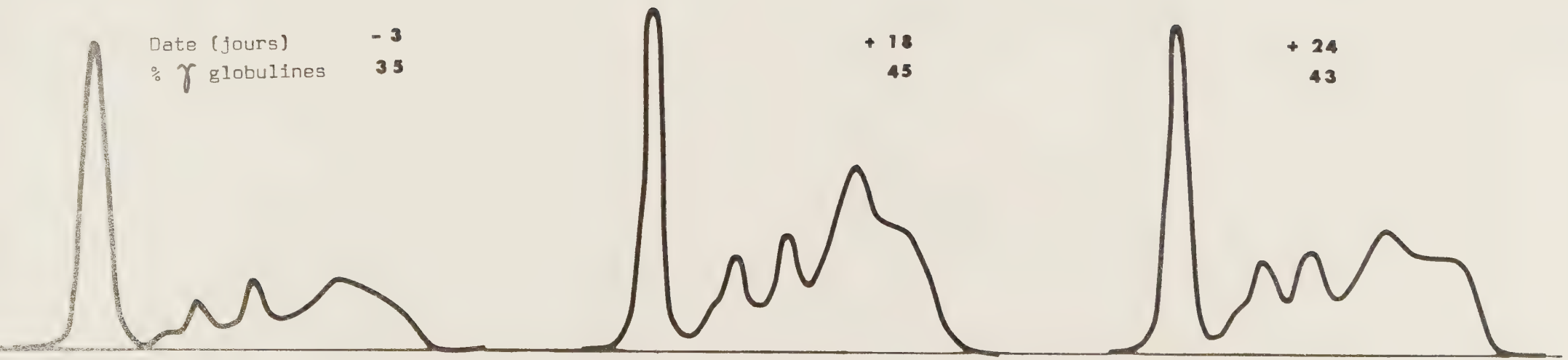


figure 47 : Protéinogrammes de la jument Bienvenue avant et après l'infection par le virus AIF.



. Pasteur

Le cheval Pasteur a été massivement infecté en vue de la production d'antigène (figure 68). La comparaison du protéinogramme du jour + 14 et de celui du jour + 21, montre l'apparition d'un pic très net dans la zone des gamma globulines rapides (figure 48).

igure 48 : Protéinogrammes du cheval Pasteur infecté par le virus AIE, montrant l'apparition d'un pic de gammaglobulines rapides.

Date (jours)	+ I4	+ 2I
% γ globulines	29	39

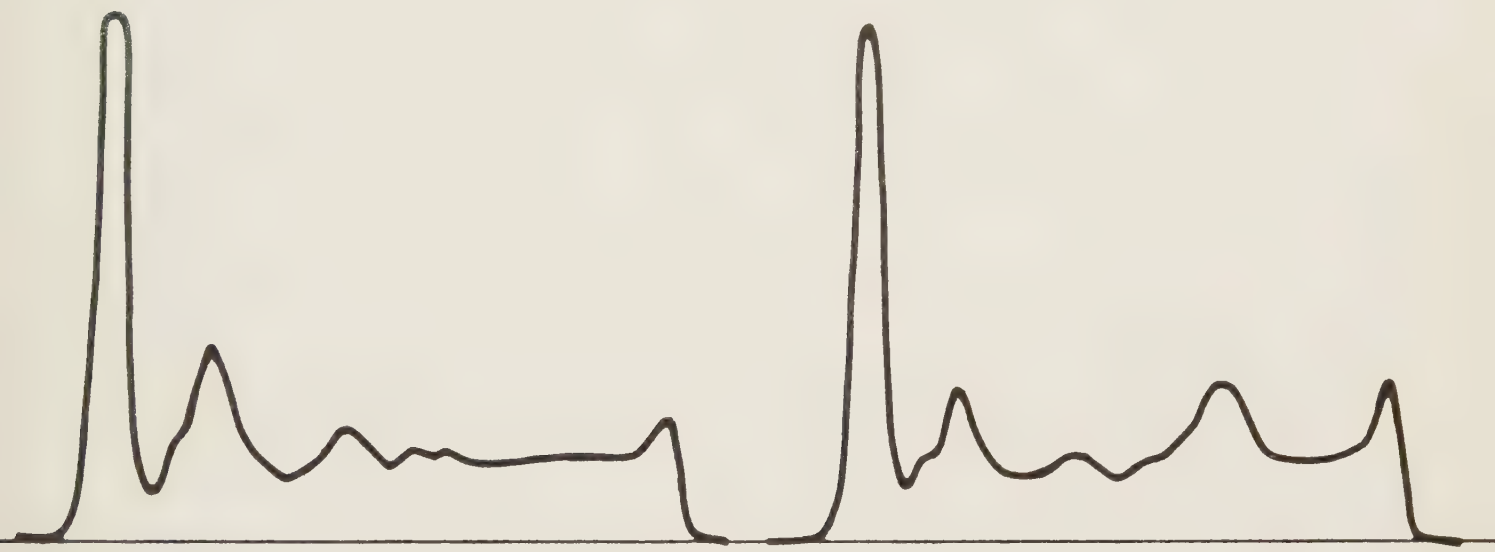
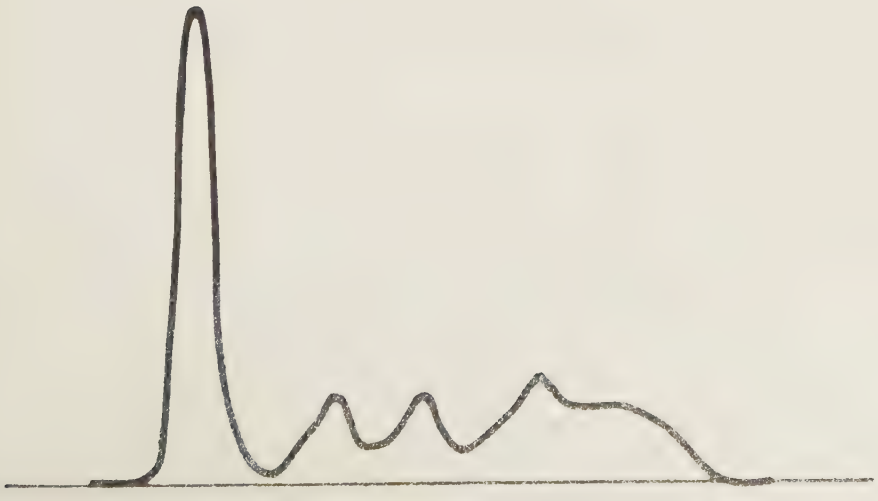


figure 49 : Exemple de protéinogramme du cheval Sy infecté par le virus AIE depuis 8 ans.

% γ globulines 31



. Tinamite

Le poney Tinamite, infecté à l'aide d'une souche française (Alfort Arlette), a présenté plusieurs crises d'AIE (figure 33). Les précipitines anti G sont apparues 19 jours après l'inoculation, tandis que les précipitines anti C n'étaient décelables que très tardivement, au jour + 71. Le pourcentage initial de gamma globulines était élevé, voisin de 30 : 31 au jour -35 (figure 50), 30 au jour -20, 29 le jour de l'épreuve, 31 au jour + 7 et 30 au jour + 14.

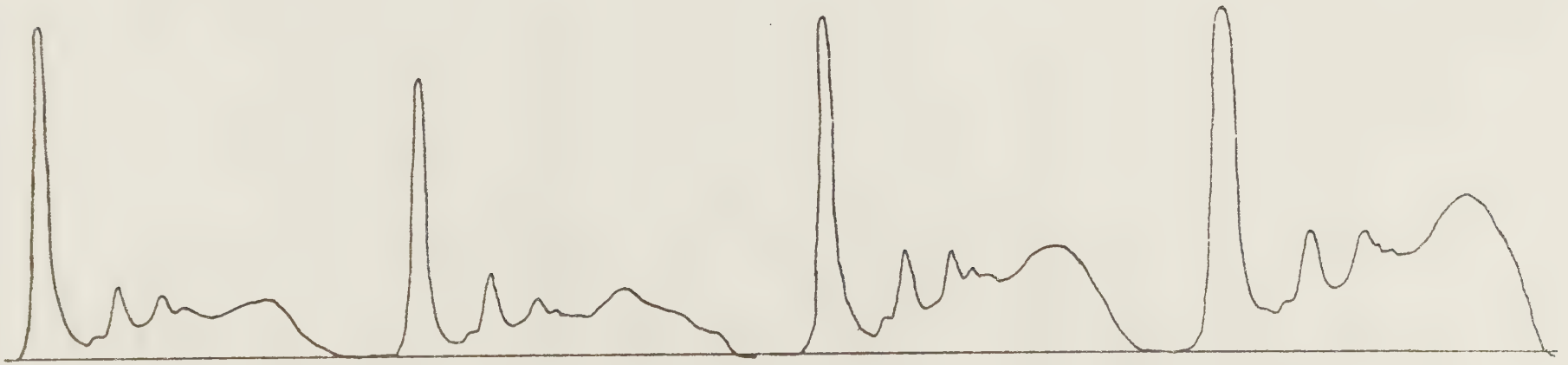
Au jour + 19, soit 5 jours après l'apparition de la fièvre, les précipitines anti G étaient décelables pour la première fois (absentes au jour + 16), et le protéinogramme présentait les premiers changements : le pourcentage de gamma globulines passait à 39 et on notait une augmentation localisée plus spécialement dans la zône des gamma globulines rapides.

Au jour + 71, les précipitines anti C apparaissaient, les gamma globulines restaient en quantité importante (36 p. cent, mais leur distribution était plus symétrique qu'au jour 19 (figure 50). L'aspect du protéinogramme du jour + 132 n'est guère modifié ; le taux des gamma globulines demeure important (39 p. cent). Après une nouvelle crise (jours + 145 à + 150, figure 33), le pourcentage des gamma globulines atteindra 44 au jour + 152.

.../..

figure 50 : Protéinogrammes du poney Tinamite à divers stades de son infection par le virus AIE.
Les dates indiquées sont celles de la figure 33 (Nombre de jours après l'infection).

Date (jours)	- 35	+ 19	+ 71	+ 132
Sidéroleucocytes	0	140	290	8
Anti G	0	1/8	1/128	1/32
Anti C	0	0	1	1/16
% γ globulines	31	39	36	39



. Gélose

Après avoir reçu plusieurs injections de précipitogène G, le poney Gélose a été infecté par la souche Wyoming de virus AIE. Il est mort 19 jours après l'épreuve (figure 51).

Avant la première injection du précipitogène G, le pourcentage des gamma globulines était déjà élevé : 28 au jour -3 (figure 51). Après les injections de précipitogène G et avant l'inoculation, le tracé du protéinogramme s'est peu modifié et la proportion des gamma globulines a oscillé entre 27 (jour + 14) et 34 (jour + 29), avec 32 au jour + 44, 33 au jour + 50 et 29 au jour + 54.

Après l'inoculation, le pourcentage est resté au même niveau : 30 au jour + 68 (7 jours après l'infection) et au jour + 72, 31 au jour + 75 (figure 51) et 29 au jour + 78, veille de la mort.

Le tracé du jour + 75 (figure 51) n'est pas très différent de celui du jour -3.

.../..

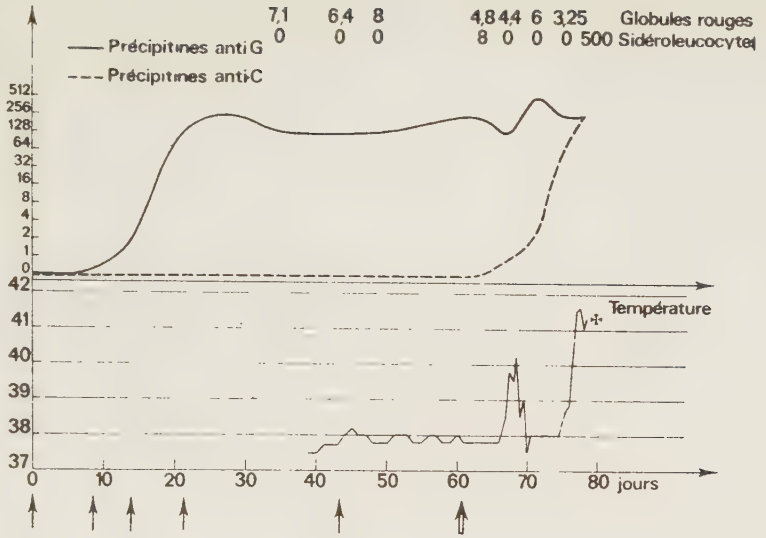
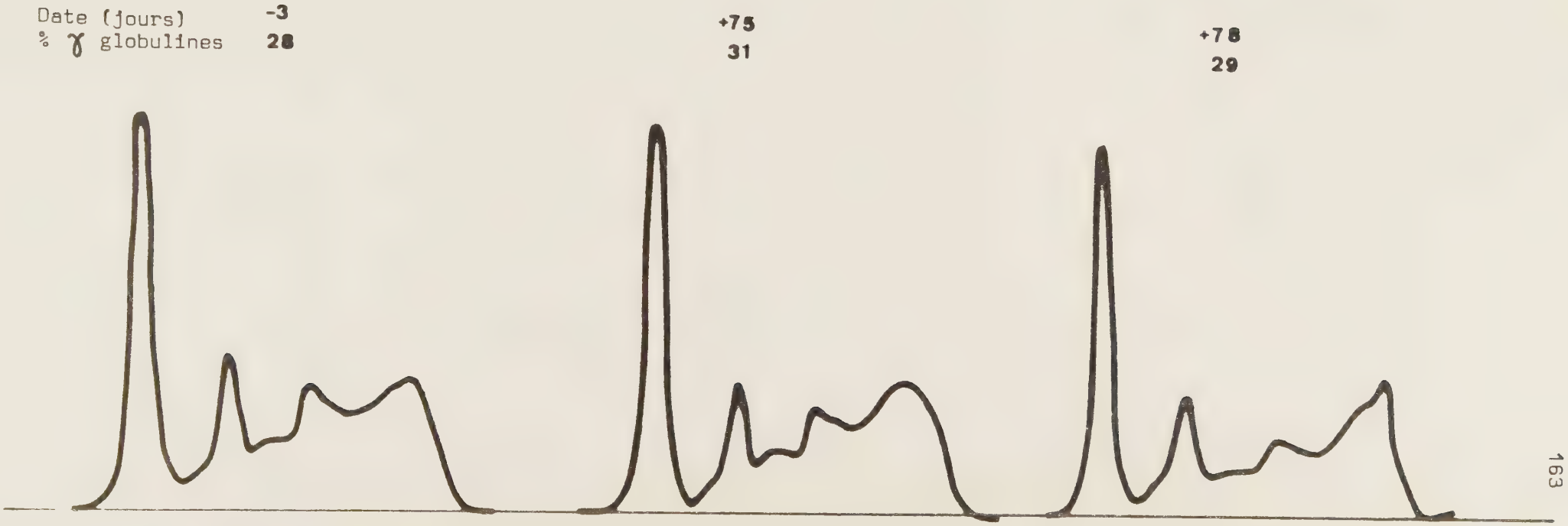


figure 51 : Protéinogrammes du Poney Gélose ayant reçu des injections d'antigène G (aux jours 0, 7, 14, 21 et 43) puis le virus AIE souche Wyoming au jour 60. (mort au jour 79).



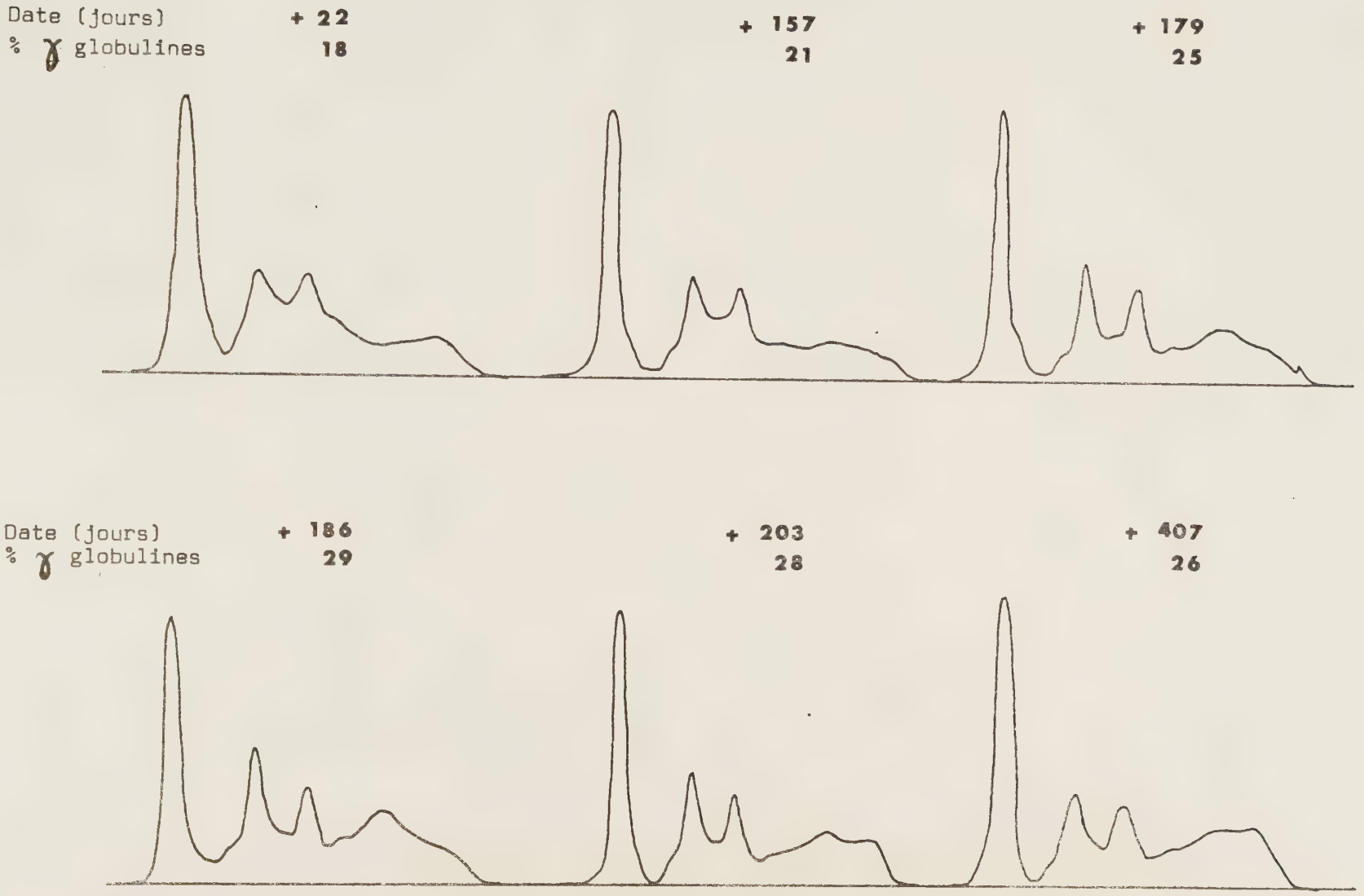
. Bianco

Le poney Bianco a reçu plusieurs injections de précipitogène C avant d'être infecté par la souche Wyoming de virus AIE (figure 45). Au cours de la période d'immunisation, le pourcentage des gamma globulines est resté faible, compris entre 16 et 21 (figure 52).

Après l'infection (jour + 168), les gamma globulines ont augmenté : 26 p. cent au jour + 175 (soit 7 jours après l'inoculation), 25 p. cent au jour + 179. Dès ce moment, et alors que les précipitines anti G ne sont pas encore présentes (figure 45), on peut noter l'apparition d'un pic de gamma globulines rapides (figure 52). Celui-ci s'accentue au jour + 186, en même temps que le pourcentage atteint 29 et que les précipitines anti G apparaissent (figures 45 et 52). Ce pourcentage demeure de l'ordre de 28 jusqu'au jour +203, mais le pic des gamma globulines diminue et oscille aux environs de 23 pour remonter légèrement ensuite (26 au jour + 407).

.../..

figure 52 : Protéinogrammes du Poney Bianco à divers stades de son infection par le virus AIE.
Se reporter aux figures 45 et 71.



. Géronimo

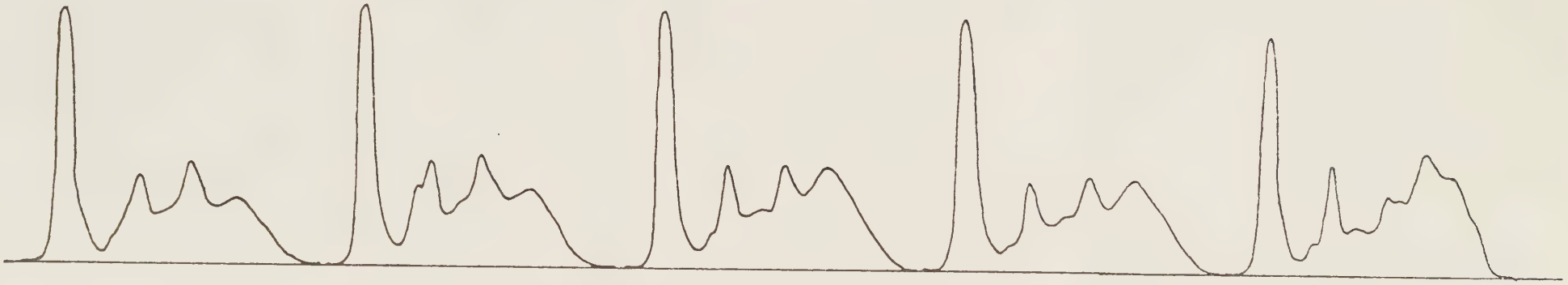
Le poney Géronimo a d'abord reçu plusieurs injections du précipitogène G, puis a été infecté par la souche Wyoming (figures 43 et 44).

Initialement, le taux des gamma globulines était relativement faible : 21 p. cent au jour - 3 ; il l'est resté après les deux premières injections de précipitogène G : 21 au jour + 14 (figure 53). 6 jours après la dernière injection de précipitogène G, soit au jour + 49, les gamma globulines augmentent : 30 p. cent. Au jour + 67, soit 7 jours après l'épreuve, le tracé du protéinogramme ne s'est pas modifié. Après la première crise d'AIE et alors que les précipitines anti G et anti C atteignent le titre record de 1/4096 (au jour + 89), le tracé évolue, le taux des gamma globulines augmente, atteint 37 p. cent, avec un pic plus marqué parmi les gamma globulines rapides, puis 42 p. cent, au jour + 95, avec un décalage du sommet des gamma globulines vers la droite. Ultérieurement, le pourcentage des gamma globulines oscille entre 33 et 40 avec des maximums à 40 aux jours + 166 (12 jours après la 4ème crise) et + 215 (8ème crise).

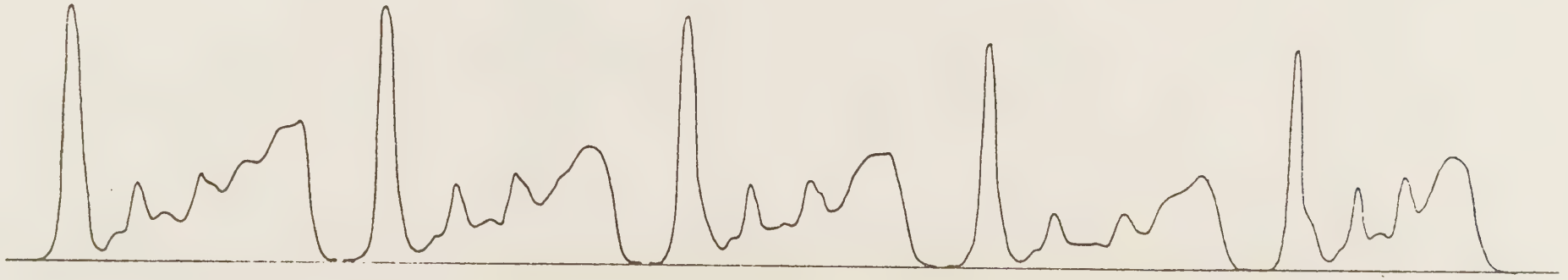
.../..

figure 53 : Protéinogrammes du Poney Géronimo à divers stades de l'évolution de son infection par le virus AIE. Se reporter à la figure 44 .

Date (jours)	- 3	+ 14	+ 49	+ 67	+ 89
% γ globulines	21	21	30	29	37



Date (jours)	+ 95	+ 125	+ 166	+ 215	+ 267
% γ globulines	42	37	40	40	38



- Equidés anciennement infectés (AIE naturelle)

4 cas peuvent être étudiés.

. Le Fortuné

Le Fortuné est un cheval producteur de sérum, infecté spontanément d'AIE depuis au moins 18 mois lorsqu'il reçoit une inoculation de virus souche Wyoming. L'évolution de différents paramètres et des protéinogrammes est représentée sur la figure 54.

On y constate :

- qu'à l'origine, le taux des gamma globulines est élevé (33 p. cent) ce qui s'explique doublement par l'état de producteur de sérum et par l'infection virale ;

- que ce taux augmente au cours des semaines suivant l'inoculation, parallèlement au développement de la maladie, pour atteindre 45 p. cent, 5 jours avant la mort ;

- que la zône des gamma globulines rapides augmente en importance au cours du temps.

.../..

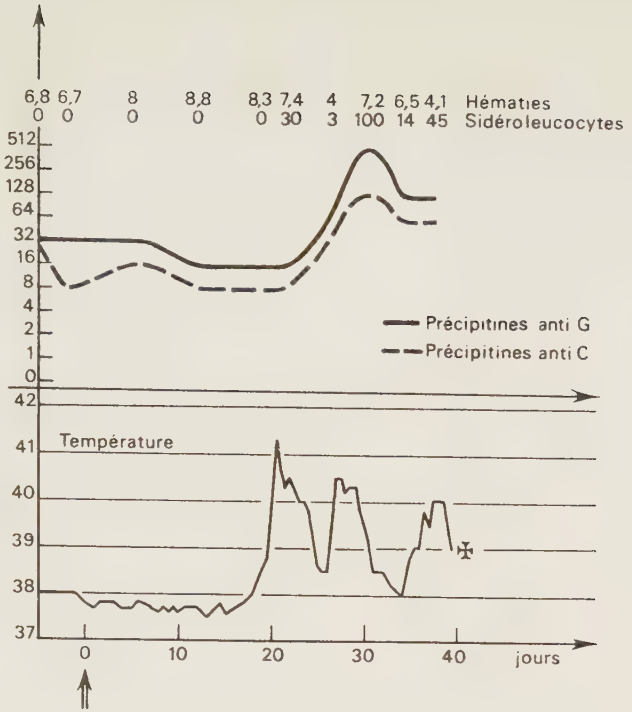
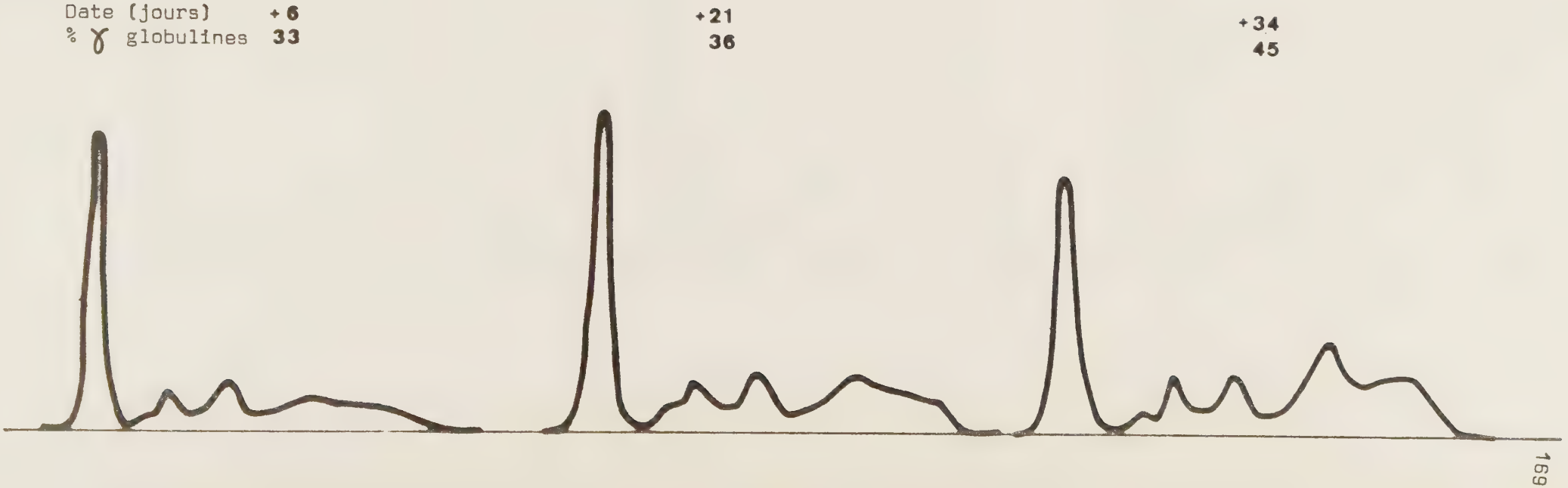


figure 54 : Protéinogrammes du cheval Le Fortuné après une nouvelle infection par le virus AIE, souche Wyoming.



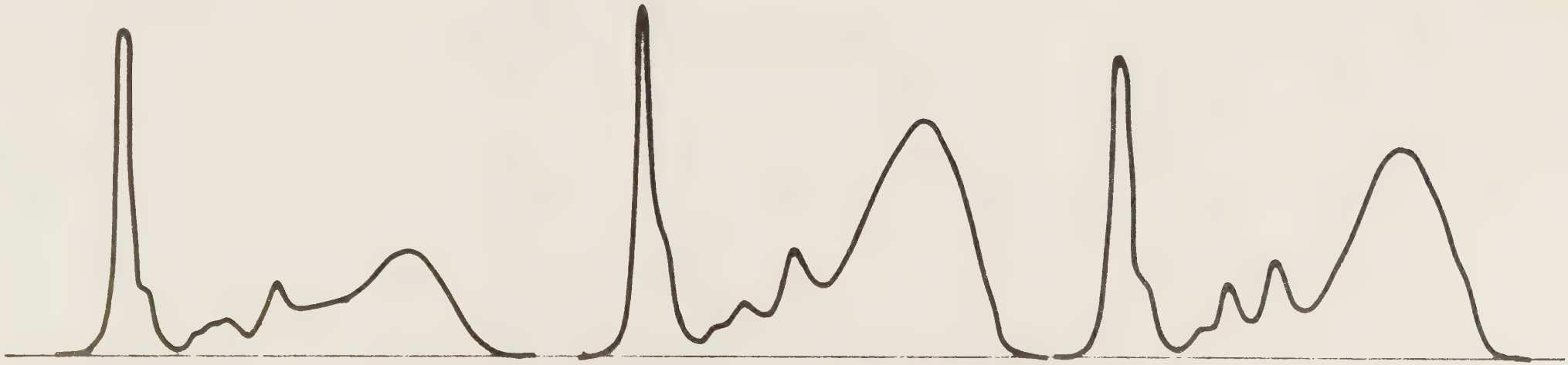
. Arlette

Arlette est une jument utilisée pour la production de sérum et infectée par le virus AIE depuis plusieurs mois. L'histoire de son infection initiale n'est pas connue. A partir de juillet 1972, elle a présenté une forme chronique d'AIE avec anémie intense, fort taux de sidéroleucocytes, faible taux de précipitines anti G et peu ou pas de précipitines anti C (figure 38). Le premier échantillon de sérum disponible montre l'importance des gamma globulines qui atteignent 38 p. cent, pour les mêmes raisons que Le Fortuné.

En juillet 1972 (jour + 54), alors qu'elle n'est plus utilisée pour la production de sérum depuis plusieurs mois et après le sevrage de son poulain, le protéinogramme révèle une augmentation très importante des gamma globulines : 57 p. cent. Ce taux de gamma globulines va se maintenir au cours des mois suivants (figure 55). Il faut remarquer, dans ce cas, la discordance entre le taux élevé de gamma globulines et le faible titre des précipitines anti AIE.

figure 55 : Protéinogrammes de la jument Arlette à divers stades de l'évolution de son infection par le virus AIE. Les dates ont été indiquées par rapport à la figure 38.

Date (jours)	- 198	+ 54	+ 309
Hématies		1,9	2,8
Sidéroleucocytes		320	1900
Titre anti G	1/32	1/64	1/32
Titre anti C	1/2	1/2	
% γ globulines	38	57	57



. Retz

Ce cheval, infecté dans les conditions naturelles par le virus AIE, a reçu plusieurs inoculations de la souche Wyoming (figure 39).

A la suite de la première inoculation (jour + 327), aucune réaction n'avait été notée. Au cours de cette période, le pourcentage des gamma globulines avait oscillé entre 24 et 28.

Deux jours avant la deuxième inoculation (qui a eu lieu à jour + 433, figure 64) il était de 24 (figure 56). Cinq jours après l'inoculation, le cheval est en crise, le titre des précipitines anti G diminue, les sidéroleucocytes apparaissent et le taux des gamma globulines augmente : 29 p. cent. Deux jours plus tard, la crise est à son acmé, les gamma globulines atteignent 34 p. cent avec un pic plus marqué pour les gamma globulines rapides. Au cours des jours suivants, le pourcentage des gamma globulines va encore augmenter pour atteindre 37 puis 44, tandis que le pic se déplace vers la droite (figure 56).

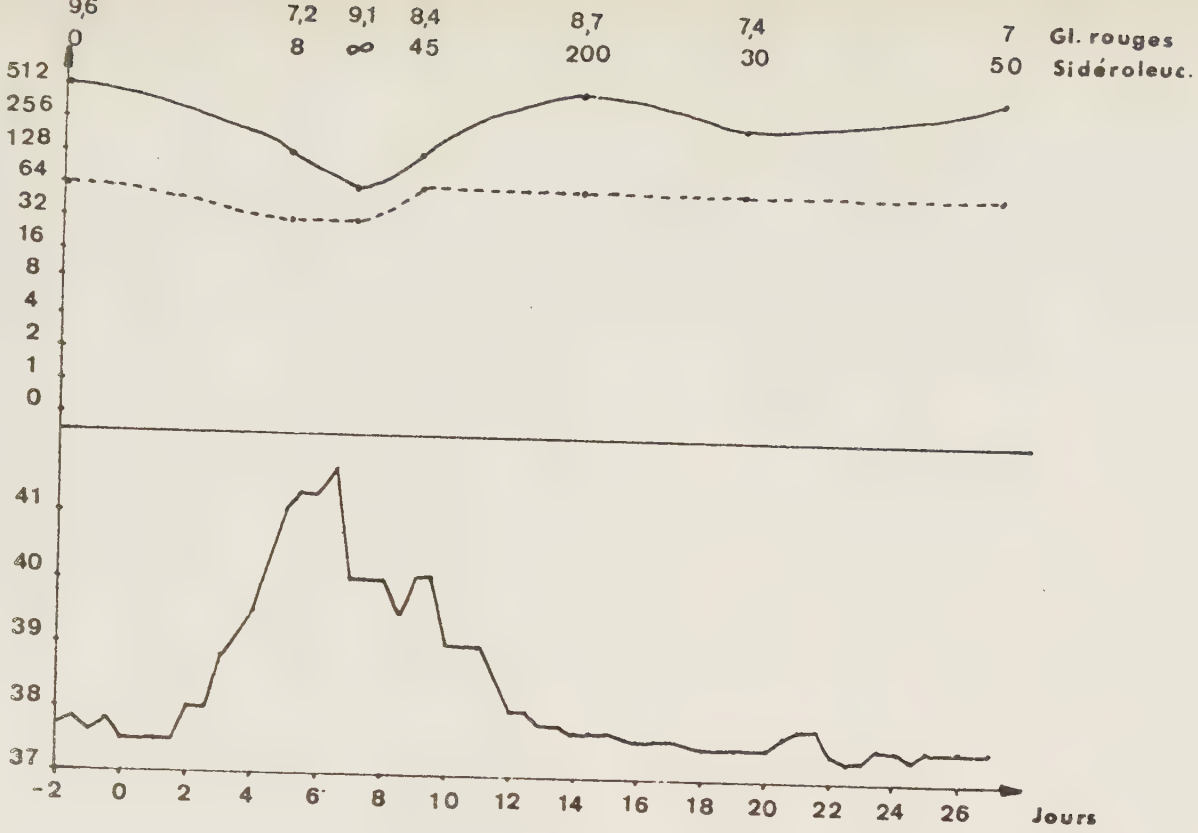
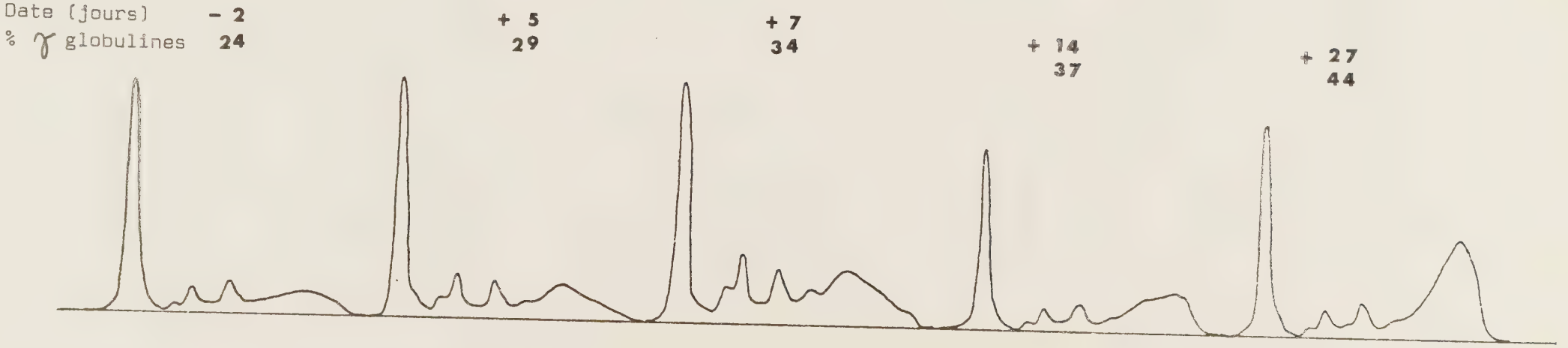


figure 56 : Protéinogrammes du cheval 'Retz' avant, pendant et après une crise d'AIE. Le jour 0 correspond à la deuxième inoculation de la souche Wyoming (jour 433 de la figure 64).



. Sy

Plusieurs échantillons de sérum de ce cheval infecté depuis 8 ans, ont été étudiés au cours d'une période de 2 mois. Ils ont tous fourni l'aspect présenté sur la figure 49. Le pourcentage des gamma globulines oscille autour de 31 et l'on constate un pic dans la zone des gamma globulines rapides.

b) Résultats généraux

L'étude des échantillons de sérums de chevaux sains puis infectés par le virus AIE conduit à un certain nombre de constatations : les électrophorégrammes d'équidés sains peuvent présenter de grandes variations dans le tracé et dans la proportion des diverses fractions. En particulier, le pourcentage des gamma globulines peut varier depuis des valeurs relativement basses comme 16 (Bianco, Noiraud) jusqu'à des taux élevés dépassant 30 (Tinamite, Bienvenue).

Après infection par le virus AIE, dans la plupart des cas, on assiste à une augmentation progressive du taux des gamma globulines. Cette augmentation peut être précoce, contemporaine de la fièvre et de l'apparition des précipitines, voire antérieure, notamment pour les précipitines anti C (Tinamite, Bianco, Noiraud, Bienvenue). Elle porte en général, d'abord sur les gamma globulines rapides, puis se déplace vers les gamma globulines lentes (Tinamite, Bianco, Géronimo).

Au cours d'une crise ultérieure d'AIE on retrouve les mêmes caractères (Retz).

Entre les crises, le taux des gamma globulines a tendance à diminuer. Il peut néanmoins rester élevé, accompagné d'un tracé particulier chez des chevaux en état d'infection inapparente (Sy).

Lors de forme chronique, le pourcentage des gamma globulines peut atteindre des valeurs très élevées (60 chez Arlette) sans parallélisme avec le taux des précipitines.

Lors d'évolution favorable, le taux des gamma globulines peut redevenir faible.

Enfin, certains équidés ne présentent pas de modification notable de leur protéinogramme au cours de l'évolution d'AIE, bien que celle-ci conduise rapidement à la mort (Gélose).

L'augmentation des gamma globulines chez les équidés infectés par le virus AIE peut être précoce, contemporaine de l'apparition des précipitines, puis permanente ou transitoire en fonction de l'état clinique de l'animal. Elle peut faire défaut.

.../..

B/ Nature des précipitines

- Différents sérums de chevaux infectés par le virus AIE ont été soumis à une chromatographie sur colonne de DEAE cellulose, dans les conditions signalées précédemment.

Il s'agit (tableau XXII) :

- d'un sérum de Tétu (poney ayant reçu une injection intradermique de 0,1 ml de virus souche Wyoming, puis, 84 jours après, une injection de 5 ml d'une souche française Alfort Retz, figure 67) prélevé 252 jours après l'infection initiale,

- d'un sérum de Retz (cheval atteint naturellement d'AIE et ayant reçu, ultérieurement, des inoculations de virus souche Wyoming, figure 39), prélevé 22 mois après sa contamination,

- d'un sérum de Solitaire (jument infectée expérimentalement à l'aide d'une souche française Solo, et n'ayant jamais présenté de crise d'AIE tout au long des 8 années d'observation, malgré plusieurs injections de virus souche Wyoming et diverses tentatives de déclenchement d'une crise, GORET et coll., 1969) prélevé 7 ans et 6 mois après l'inoculation initiale,

- d'échantillons de sérum de Eden (poney ayant reçu une injection de la souche Wyoming adaptée à la culture cellulaire E.D., figure 31) prélevés 58 et 82 jours après l'infection (Eden 1) et 140 jours après l'infection (Eden 2),

- de cinq échantillons de sérum de Géronimo (poney ayant d'abord servi à la production d'anticorps anti G, puis infecté par la souche Wyoming et ayant présenté plusieurs crises d'AIE, figures 44 et 72) prélevés à différentes dates avant et après l'infection : 20 jours avant l'infection (J40 de la figure 44) : Géronimo 1 ; 31 jours après l'infection (J91 de la figure 44) : Géronimo 2 ; 140 jours après l'infection (J200 de la figure 44) : Géronimo 4 ; 662 jours après l'infection.

Les éluats de la chromatographie de chaque sérum sont divisés en quatre fractions portant les numéros 1, 1 bis, 2 et 3 dont la densité optique à 280 nm est mesurée et l'activité précipitante anti G et anti C titrée par immunodiffusion en gélose.

.../..

TABLEAU XXII : Activité précipitante vis-à-vis de l'antigène G, des différentes fractions résultant de la chromatographie de sérums ou de colostrum sur colonne de DEAE cellulose. Le nombre entre parenthèses indique le pourcentage.

Equidé	Délai séparant l'infection du prélèvement de sérum	Pic 1	Pic 1 bis	Pic 2	Pic 3
Tétu	252 jours	640 (51)	51 (4)	104 (8)	456 (37)
Retz	environ 670 jours	5.528 (81)	310 (4)	672 (10)	336 (5)
Solitaire	7 ans et 6 mois	5.376 (57)	2.176 (23)	1.440 (15)	512 (5)
Eden 1	58 à 82 jours	512 (25)	184 (9)	140 (7)	1.184 (59)
Eden 2	140 jours	31.744 (52)	5.376 (8)	8.960 (16)	14.848 (24)
Géronimo 1		1.048 (49)	330 (15)	137 (7)	624 (29)
Géronimo 2	31 jours	27.648 (89)	1.056 (3)	620 (2)	1.920 (6)
Géronimo 3	140 jours	496 (42)	96 (8)	205 (18)	384 (32)
Géronimo 4	300 jours	2.080 (26)	648 (8)	1.640 (20)	3.680 (46)
Géronimo 5	662 jours	280 (15)	550 (29)	371 (19)	704 (37)
Colostrum de Douro		13.312 (62)	416 (2)	4.224 (19)	3.648 (17)

Le contenu de chaque fraction en immunoglobulines est illustré par immunoélectrophorèse (planche VIII). Les fractions 1 et 1 bis contiennent des IgG et sont dépourvues d'IgT. Les fractions 2 (en général) et 3 renferment des IgT et d'autres immunoglobulines de mobilité bêta 2.

Le rendement en protéines de chaque chromatographie de sérum est compris entre 77 p. cent et 95 p. cent (Eden 1 : 77 p. cent ; Géronimo 3 : 81 p. cent ; Géronimo 5 : 85 p. cent ; Eden 2 : 92 p. cent ; Géronimo 2 : 94 p. cent ; Géronimo 1 : 95 p. cent).

. Le tableau XXII indique, pour chaque sérum, l'activité précipitante anti G de chaque fraction. Elle est mentionnée également sur les figures 57 à 59 qui représentent le diagramme d'élution des sérums de Tétu, Retz et Géronimo 4. Le rendement en activité précipitante anti G après chromatographie, a varié de 48 à 82 selon les sérums. Ces nombres doivent être considérés seulement comme des ordres de grandeurs, compte-tenu de l'imprécision relative du titrage des précipitines par immunodiffusion en gélose.
L'activité précipitante anti G de chaque fraction varie selon le sérum. La majorité des précipitines anti G est retrouvée en général dans les fractions contenant les IgG (fractions 1 et 1 bis). Cependant, dans certains cas, on la rencontre dans les fractions riches en IgT (fractions 2 et 3), en particulier pour les sérums Eden 1 et Géronimo 4.

. Dans le tableau XXIII sont regroupés les résultats de l'étude des précipitines anti C, sur le même principe que pour le tableau XXII.
L'activité précipitante anti C de chaque fraction des sérums de Tétu, Retz et Géronimo 4 est représentée sur les figures 57 à 59.
Le pourcentage de l'activité précipitante anti C retrouvée, par rapport à celle de l'inoculum, varie de 40 à 97.
L'activité précipitante anti C se situe d'une manière plus marquée dans les fractions contenant les IgT (fractions 2 et 3) que l'activité anti G.
La proportion de précipitines anti C présentes dans les fractions 2 et 3 semble augmenter lors d'évolution d'une AIE sévère (ex : Eden et Géronimo). En revanche, elle reste faible pour des chevaux atteints d'une forme inapparente, même si l'infection est ancienne (Retz et Solitaire).

- Par ailleurs, le colostrum d'une jument infectée par le virus AIE dans les conditions naturelles, a été soumis à des techniques de fractionnement destinées à séparer les IgM, les IgA secrétoires et les immunoglobu-

.../..

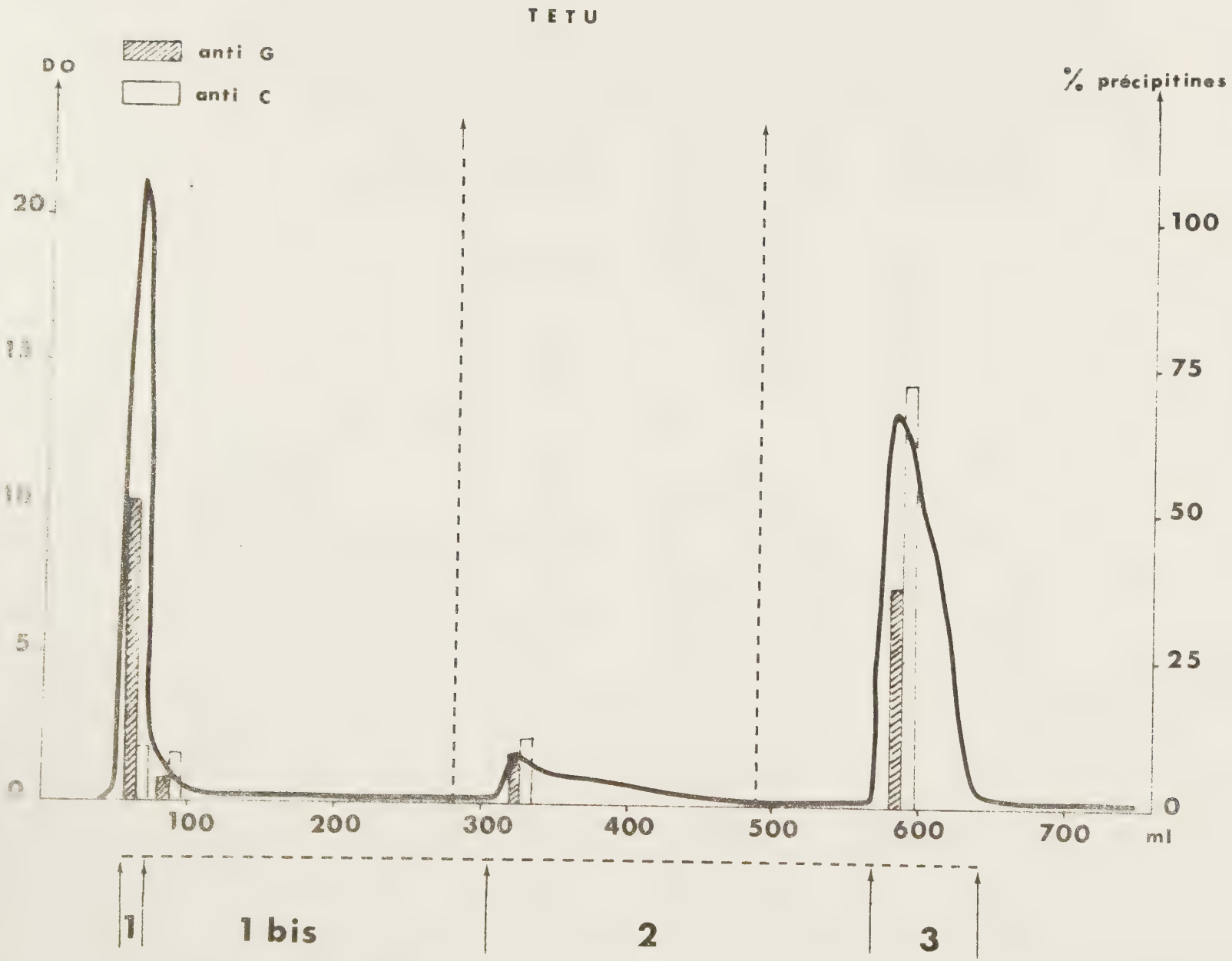
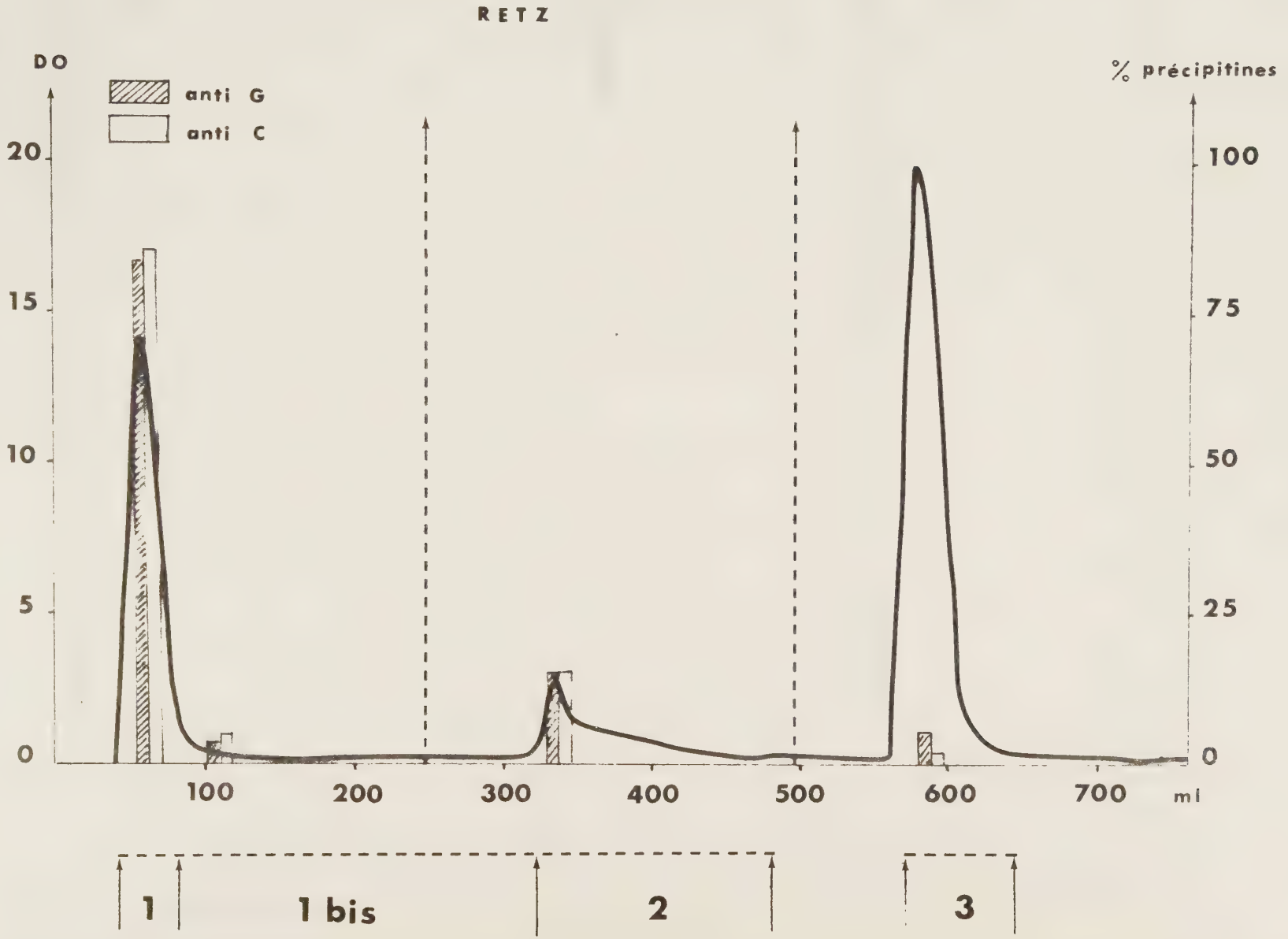


Figure 27 :
Résultat de la chromatographie sur DEAE cellulose d'un sérum de Tétu

figure 58 : Résultat de la chromatographie sur DEAE cellulose du sérum de Retz



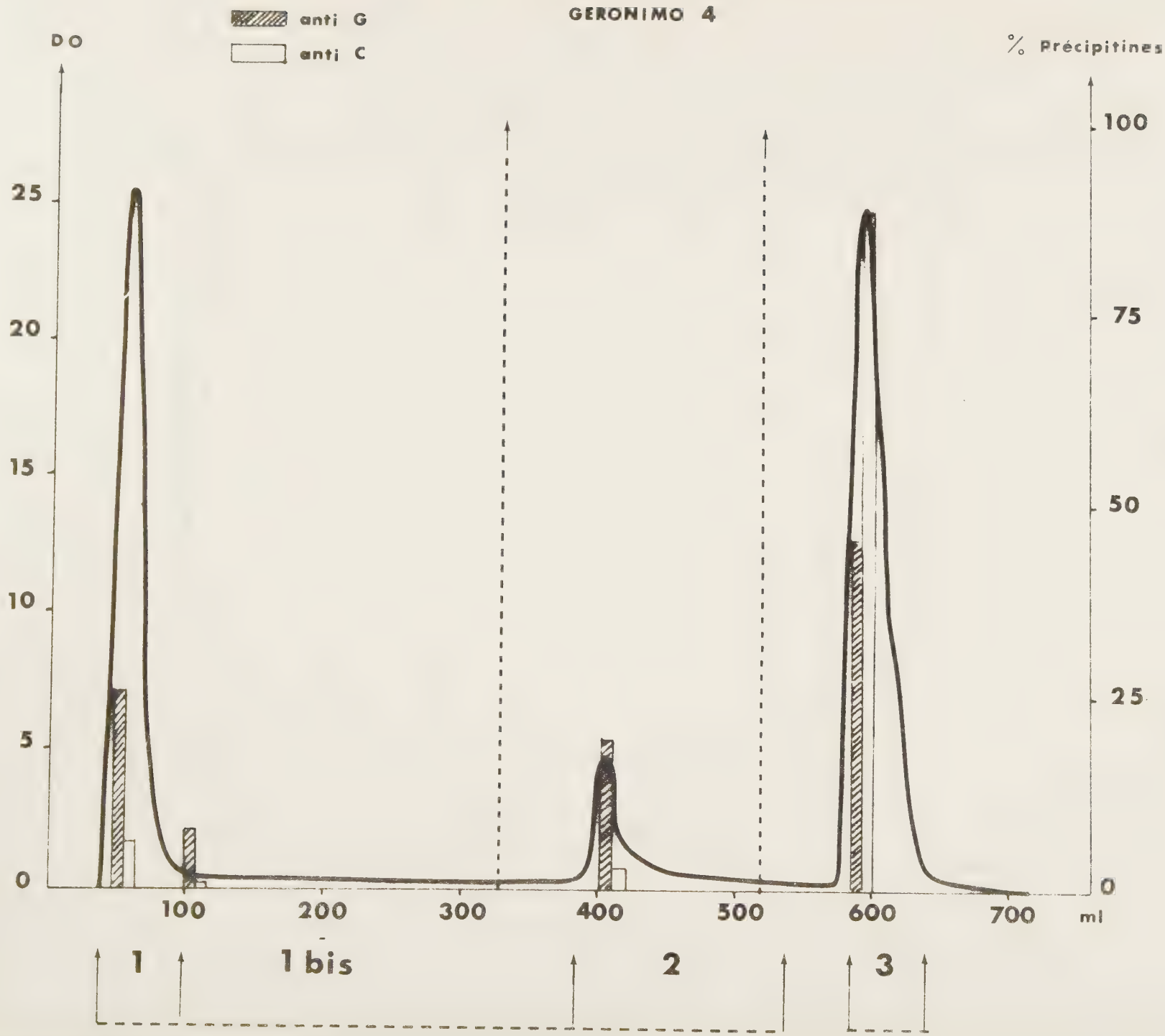


figure 50 :

Résultat de la chromatographie sur DEAE cellulose du sérum de Géronimo 4.

TABLEAU XXIII : Activité précipitante vis-à-vis de l'antigène C, des différentes fractions résultant de la chromatographie de sérums ou de colostrum, sur colonne de DEAE cellulose. Le nombre entre parenthèses indique le pourcentage.

Equidé	Pic 1	Pic 1 bis	Pic 2	Pic 3
Tétu	640 (9)	544 (8)	832 (11)	4.864 (72)
Retz	2.764 (83)	155 (5)	336 (10)	84 (2)
Solitaire	672 (30)	1.088 (50)	360 (16)	64 (4)
Eden 1	256 (40)	92 (15)	140 (22)	148 (23)
Eden 2	992 (20)	84 (2)	280 (5)	3.712 (73)
Géronimo 2	13.824 (81)	512 (3)	832 (5)	1.920 (11)
Géronimo 3	250 (29)	48 (5)	183 (21)	384 (45)
Géronimo 4	416 (5,9)	20 (0,1)	328 (5)	5.988 (89)
Géronimo 5	140 (36)	69 (18)	93 (24)	88 (22)
Colostrum de Douro	832 (40)	52 (3)	264 (13)	912 (44)

lines 7S, à savoir, une gelfiltration sur Sephadex G 200 puis une gelfiltration du premier pic obtenu, sur Sepharose 4 B et une chromatographie du second pic sur DEAE cellulose (figure 59 b). La concentration en protéines, l'activité précipitante anti G et anti C et le comportement en immunoélectrophorèse de chaque pic ont été ensuite étudiés.

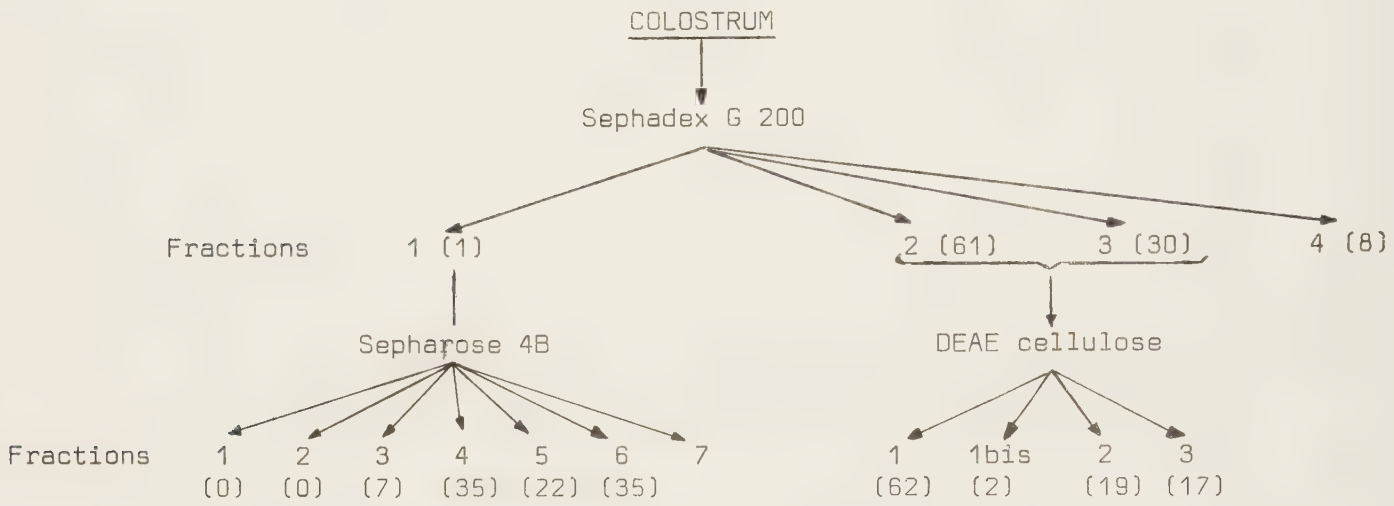


Figure 59 b : Représentation schématique des opérations de fractionnement réalisées sur le colostrum de la jument Douro infectée par le virus AIE. Les nombres entre parenthèses indiquent le pourcentage de l'activité anti G présente dans la fraction correspondante, par rapport à l'activité totale retrouvée pour l'ensemble des fractions de la même étape (figures 60 et 61). Les IgA sont situées plus particulièrement dans la fraction 4 issue du Sepharose 4B, les IgG dans les fractions 1 et 1bis issues de la colonne de DEAE cellulose et les IgT dans les fractions 2 et 3 de cette même étape.

Les tracés obtenus après gelfiltration sur Sephadex G 200 et sur Sepharose 4B sont présentés sur les figures 60 et 61. Après gelfiltration sur Sephadex G 200, le pic contenant les IgM et les IgA secrétoires, qui représente près de 10 p. cent des protéines initiales, ne possède que un pour cent d'activité précipitante anti G.

La majorité de l'activité précipitante anti G du colostrum se trouve dans les fractions contenant les IgG (fractions 1 et 1bis issues de la colonne contenant la DEAE cellulose, tableau XXIII b).

.../..

figure 60 : Gelfiltration sur Sephadex G200 du colostrum de la jument Douro infectée par le virus AIE. Le pourcentage de précipitines anti G retrouvées dans chaque fraction est représenté par des colonnes. Par ailleurs, le pourcentage de protéines correspondant à chaque pic est indiqué.

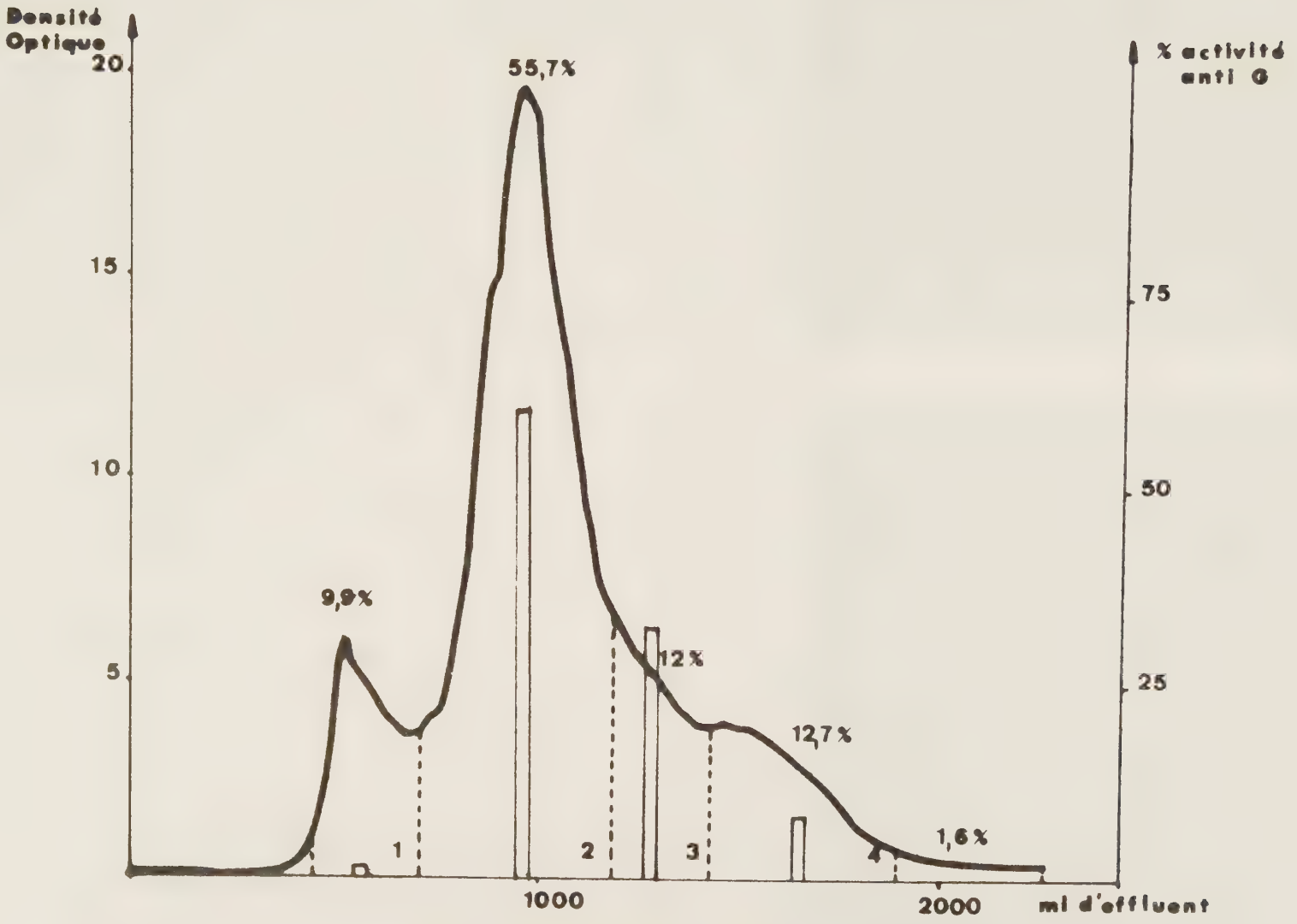
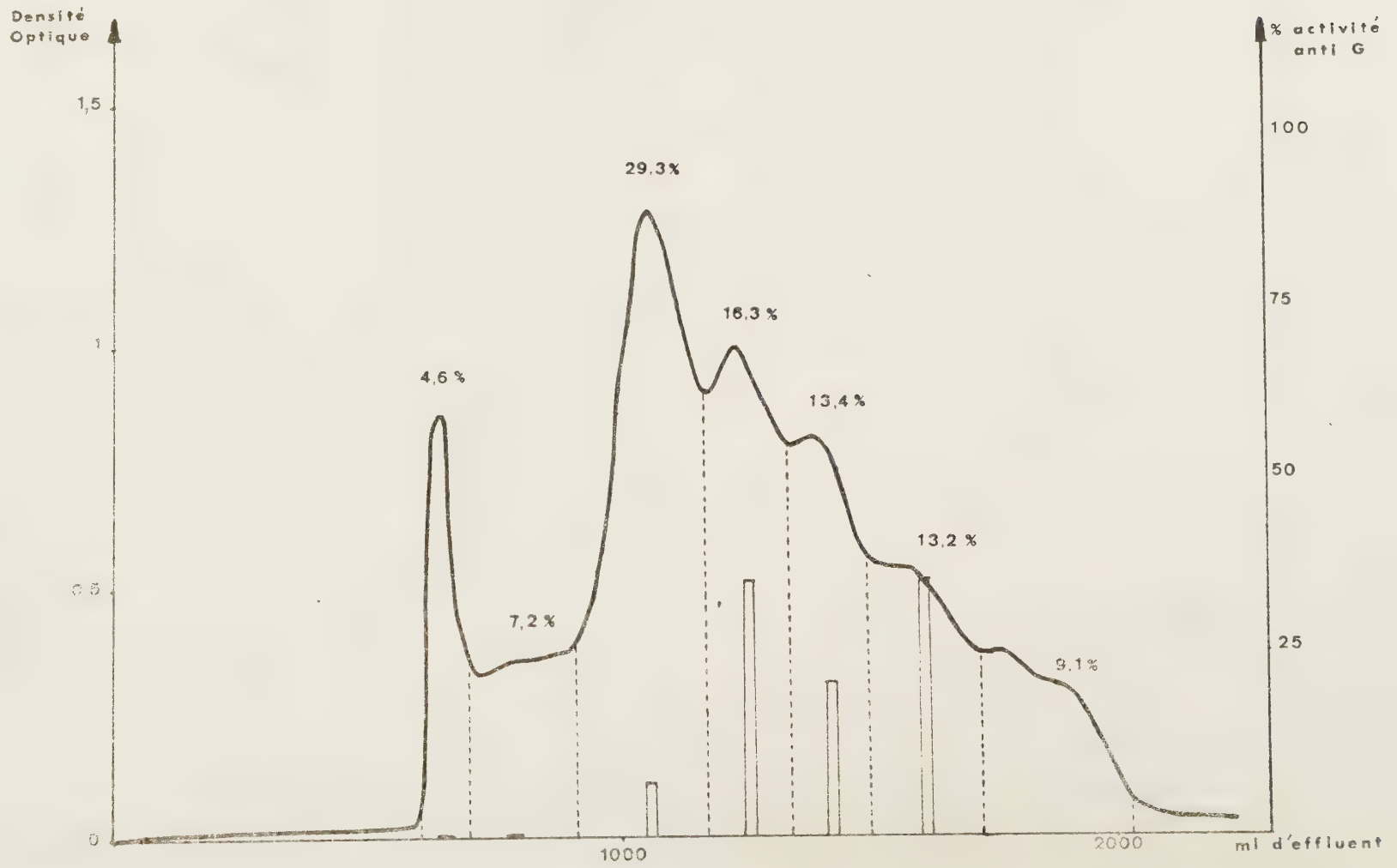


figure 61 : Gelfiltration sur Sepharose 4 B du premier pic obtenu après passage du colostrum de la jument Douro sur Sephadex G 200 (cf figure 60). Le pourcentage de précipitines anti G retrouvées dans chaque fraction est représenté par des colonnes. Par ailleurs, le pourcentage de protéines correspondant à chaque pic est indiqué.



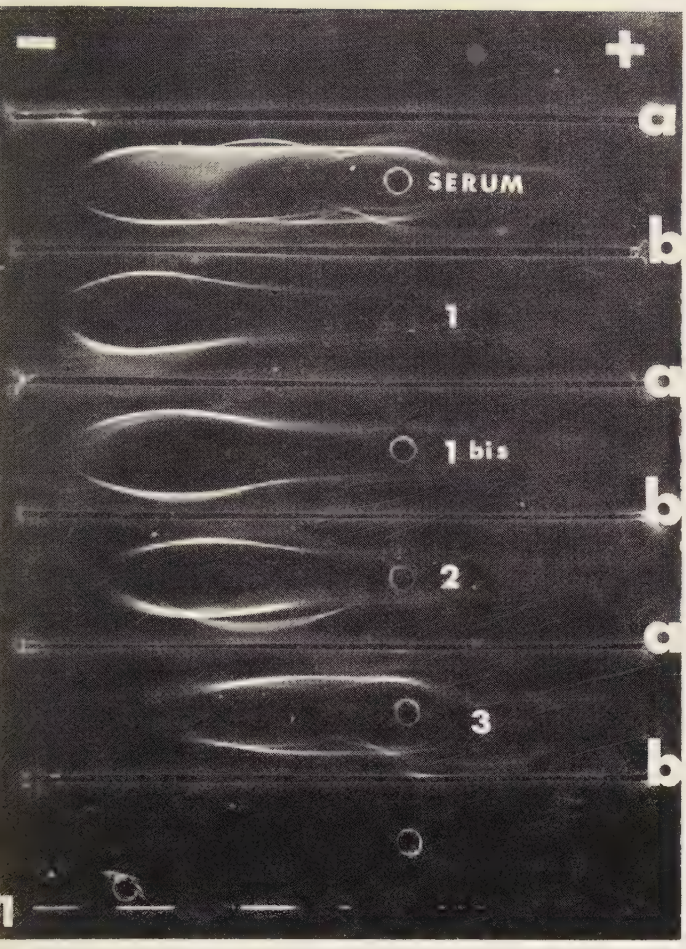


Figure 1 - Etude immunoélectrophorétique du sérum de « Géronimo 2 » et des fractions 1, 1 bis, 2 et 3 après passage sur DEAE cellulose ; a et b : sérum antisérum de cheval. Les fractions 1 et 1 bis contiennent des IgG, la fraction 2 d'autres immunoglobulines, la fraction 3 des IgT et d'autres protéines sériques.

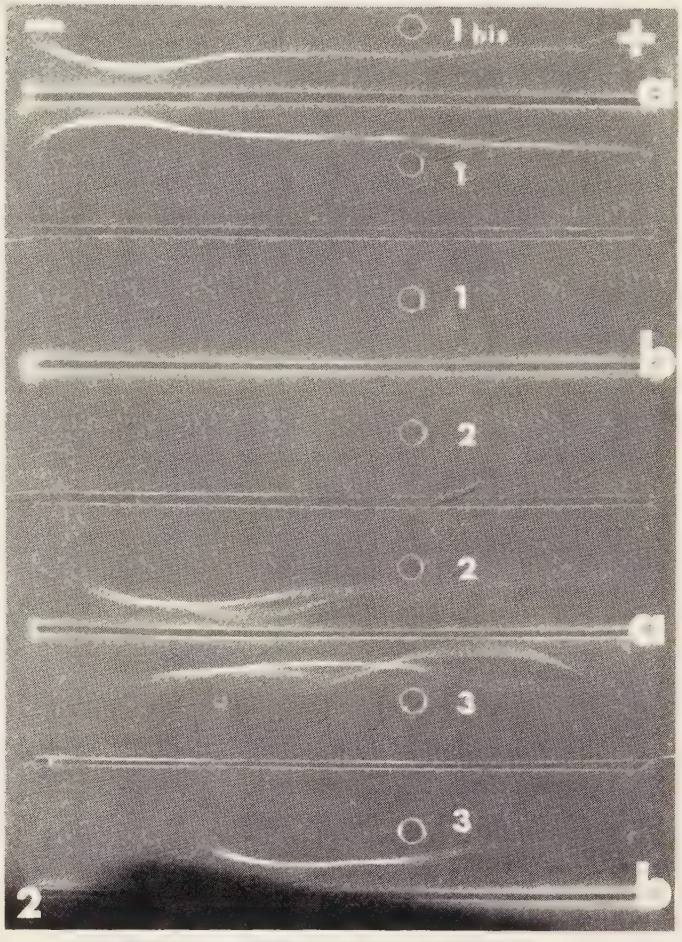


Figure 2 - Etude immunoélectrophorétique des fractions 1, 1 bis, 2 et 3 du sérum de « Géronimo 2 » passé sur DEAE cellulose ; a : sérum antisérum de cheval ; b : sérum anti-IgT. Les pics 1, 1 bis et 2 du sérum de « Géronimo 2 » ne contiennent pas d'IgT. Le pic 3 en contient.

PLANCHE VIII

TABLEAU XXIII b : Activité précipitante anti G et anti C des fractions de sérums contenant les IgG ou les IgT.

Les nombres correspondent au pourcentage d'activité précipitante.

	Pic 1 et Pic 1 bis (IgG)		Pic 2 et Pic 3 (IgT +...)	
	anticorps anti G	anticorps anti C	anticorps anti G	anticorps anti C
Tétu	55	17	45	83
Retz	85	88	15	12
Solitaire	80	80	20	20
Eden 1	34	55	66	45
Eden 2	60	22	40	78
Géronimo 2	92	84	8	16
Géronimo 3	50	34	50	66
Géronimo 4	34	6	66	94
Géronimo 5	44	54	56	46
Colostrum de Douro	64	43	36	57

Le premier pic résultant de la gelfiltration sur Sepharose 4B, qui correspond principalement aux IgM, se montre complètement dépourvu d'activité précipitante anti G et anti C. Les IgA sont situées plus particulièrement dans le pic 4 de cette même étape, mais il est impossible de savoir quel est leur rôle dans l'activité précipitante anti G car cette fraction contient d'autres protéines. Par ailleurs, des traces d'IgA sont présentes dans les fractions 3, 5 et 6 de cette même phase.

Parmi les fractions résultant de la gelfiltration sur Sepharose 4B, seule la fraction 5 possède une activité précipitante anti C.

En résumé, l'activité précipitante anti G et anti C des sérums d'équidés infectés d'AIE est rencontrée dans les fractions contenant les IgG et les IgT d'une manière variable selon les chevaux et selon la gravité de la maladie. Dans le colostrum d'une jument infectée, l'activité précipitante semble rattachée essentiellement aux IgG, secondairement aux IgT et d'une façon beaucoup plus faible, aux IgM et aux IgA.

III - L'IMMUNITE ANTI AIE

Afin d'apprécier leur immunité anti AIE, des équidés hyperimmunisés à l'aide des précipitogènes G et C ou infectés par le virus AIE ont été soumis à une ou plusieurs inoculations d'épreuve à base de virus virulent.

A/ Equidés hyperimmunisés avec le précipitogène G ou C

L'hyperimmunisation des poneys à l'aide du précipitogène G ou C ne leur a conféré aucune protection contre l'inoculation d'épreuve, malgré la présence de forts titres de précipitines anti G ou anti C.

Deux poneys, Gélose et Poney 9 (anti G) sont morts respectivement 19 et 18 jours après l'inoculation (figures 41 et 42). Les poneys Géronimo (anti G) et Bianco (anti C) ont présenté une évolution d'AIE aiguë (figures 43 et 45).

Les 3 poneys, Gélose, Géronimo et Bianco ont apparemment réagi de

.../..

façon plus sévère à l'épreuve (0,1 ml de sérum virulent, Edelweiss, souche Wyoming) que le poney témoin, Tétu, infecté dans les mêmes conditions (figure 67).

B/ Equidés infectés et soumis à des réinoculations

Les résultats de l'épreuve des équidés déjà infectés sont regroupés en fonction de la nature des souches virales.

1) Epreuve, par la souche Wyoming, d'équidés infectés par une souche française

9 équidés ont été utilisés, 4 chevaux atteints d'AIE naturelle (Le Fortuné, Uvéa, Retz et Sy), 4 poneys et un cheval infectés expérimentalement (Vril, Leticia, Retzquilleur, Tinamite et Solitaire). Le poney Retzquilleur avait été infecté par le virus prélevé sur Retz. Les 4 poneys et 2 chevaux (Sy et Retz) ont été éprouvés avec le stade Mélanose 31.8.73 de la souche Wyoming, les trois autres chevaux (Le Fortuné, Uvéa et Solitaire) avec le stade Géronimo 18.1.74 de cette même souche.

L'histoire résumée de la maladie initiale de chacun des 9 équidés ainsi que le résultat de l'épreuve par la souche Wyoming sont rassemblés dans les tableaux XXIV et XXV ainsi que sur la figure 62. L'évolution de la température, des précipitines anti G et anti C, du nombre des hématies et des sidéroleucocytes de 8 de ces 9 équidés est indiquée sur les figures 32, 33, 35, 36, 63, 64, 65 et 66.

Sur les 9 équidés, 6 (2 chevaux infectés naturellement et 4 poneys infectés expérimentalement) répondent à l'épreuve par une maladie aiguë entrainant une issue fatale entre le 20ème et le 39ème jour après l'inoculation.

En revanche, les 3 autres chevaux (2 infectés expérimentalement et un, naturellement) ne présentent aucune réaction au cours des 100 jours qui suivent l'inoculation.

Six équidés sur les neuf infectés par des souches françaises de virus AIE sont donc parfaitement sensibles à l'infection par la souche Wyoming, les trois autres semblent résistants.

L'origine de cette divergence est difficile à établir. Elle ne semble pas liée à l'espèce (2chevaux et 4 poneys meurent), ni à la souche infectante initiale (Retz et Retzquilleur sont infectés par la même souche, or l'un résiste à l'inoculation d'épreuve, l'autre meurt). Le comportement des 18 équidés lors de l'épreuve virulente, en fonction de l'ancienneté de leur

.../..

TABLEAU XXIV : Résultats de l'épreuve virulente par la souche Wyoming (0,5 ml de sérum Mélanose du 31.8.73 injecté par voie intradermique) d'équidés déjà infectés par des souches françaises de virus AIE.

Equidé	Première souche virale	Maladie observée	Durée de la guérison apparente avant l'inoculation	Délai séparant les deux infections	Résultat de l'épreuve par la souche Wyoming
Sy	Infection naturelle	Trois crises intenses d'AIE à quelques semaines d'intervalle en 1966	2555 jours	2735 jours environ	Absence de réaction au cours des 3 mois suivants
Retz	Infection naturelle	Deux crises d'AIE à 30 jours d'intervalle	150 jours	330 jours environ	Absence de réaction au cours des 3 mois suivants
Retzquilleur	Inoculation par voie intradermique de 0,01 ml d'une souche française Alfort Retz (22-3-73)	Trois pics thermiques (41ème, 78ème et 93ème jour)	98 jours	197 jours	AIE aiguë et mort le 31ème jour après l'inoculation
Leticia	Inoculation par voie intradermique de 0,01 ml d'une souche française Alfort Arlette (5-4-73)	Hyperthermie passagère au 16ème jour	178 jours	194 jours	AIE aiguë et mort le 22ème jour après l'inoculation
Tinamite	Inoculation par 10 ml de la souche française Arlette	Plusieurs crises d'AIE	150 jours	489 jours	AIE aiguë et mort le 19ème jour après l'inoculation
Vril	Inoculation par voie intradermique de 0,01 ml d'une souche française Alfort Avril (5-4-73)	Une crise d'AIE au 77ème jour	11 jours	193 jours	AIE aiguë et mort le 32ème jour après l'inoculation

TABLEAU XXV : Résultats de l'épreuve virulente par la souche Wyoming (0,5 ml de sérum Géronimo du 18.1.74, injecté par voie intradermique) de chevaux déjà infectés par des souches françaises de virus AIE.

Equidé	Première souche virale	Maladie observée	Durée de la guérison apparente avant l'inoculation	Délai séparant les deux infections	Résultat de l'épreuve par la souche Wyoming
Solitaire	Infection expérimentale (souche française Solo)	Aucune manifestation clinique d'AIE	Infection inapparente	7 ans	Absence de réaction au cours des 3 mois suivants
Uvéa	Infection naturelle (souche française)	Crise 19 mois avant l'inoculation d'épreuve	Mauvais état général	entre 20 et 23 mois	AIE aiguë et sacrifice au 22ème jour, après 5 jours de décubitus
Le Fortuné	Infection naturelle (souche française)	Pas de crise au cours des 3 dernières années	Plusieurs mois	au moins 18 mois	AIE aiguë et mort à la suite d'une crise de coliques, au 39ème jour après l'inoculation

figure 62 : Représentation schématique des résultats présentés dans le tableau XXIV. L'épreuve (0,5 ml de sérum Mélangé par voie intradermique) a été effectuée au jour 0. Pour chaque cheval, sont représentés : la fièvre par des éléments noirs proportionnels à l'intensité et à la durée de l'hyperthermie ; le nombre de sidéroleucocytes selon le code suivant :

0 : pas de sidéroleucocyte
1 : 1 à 7 sidéroleucocytes
2 : 8 à 50 sidéroleucocytes
3 : 51 à 300 sidéroleucocytes
4 : > 300 sidéroleucocytes

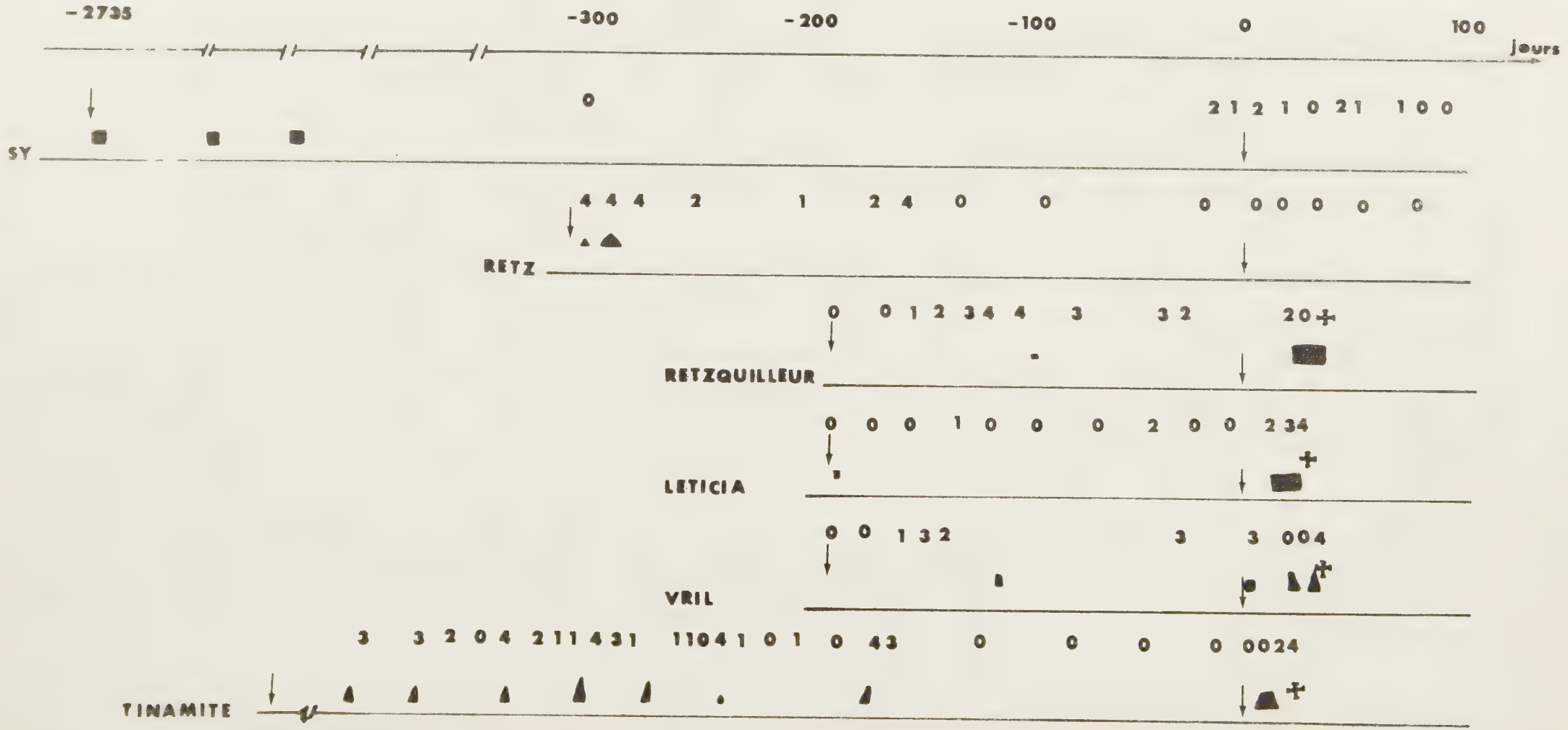


figure 63 : Cheval Sy infecté dans les conditions naturelles par une souche française de virus AIE puis, deux fois par la souche Wyoming.

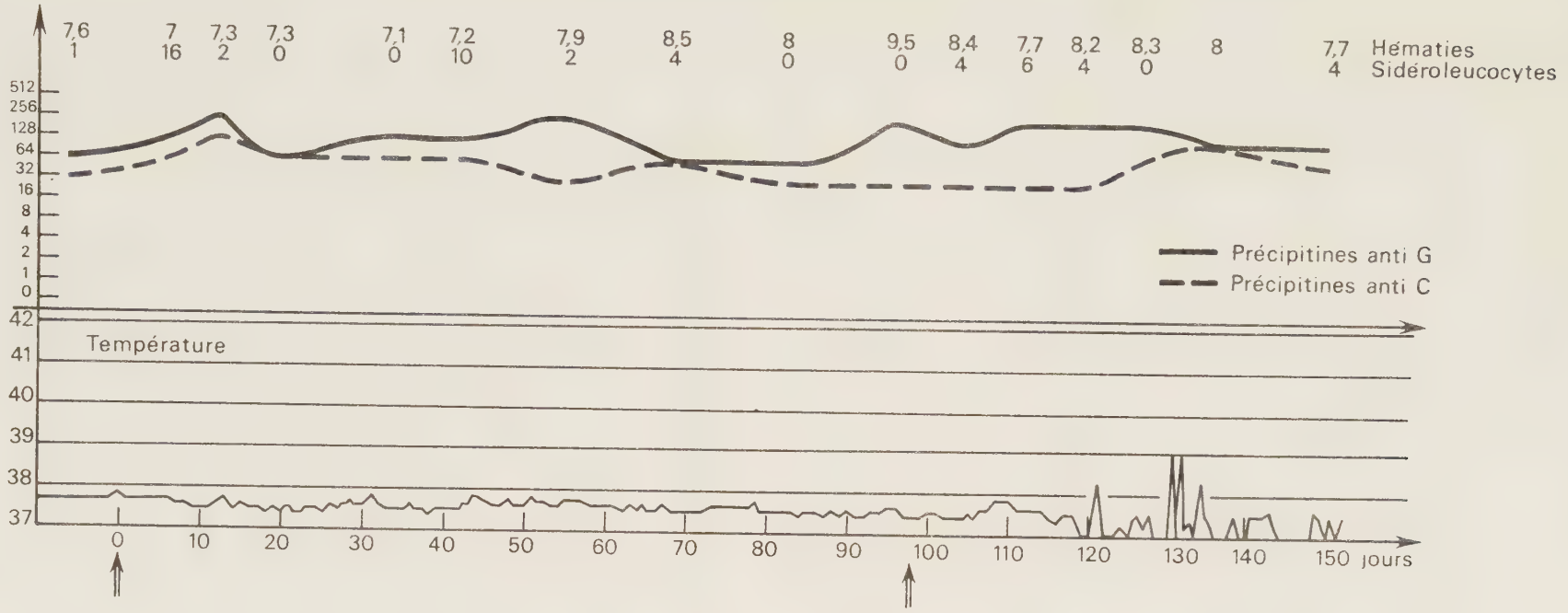


figure 64 : Cheval Retz infecté dans les conditions naturelles par une souche française de virus AIE, puis deux fois par la souche Wyoming. L'origine du temps a été fixée arbitrairement et le graphique interrompu entre les Jours 50 et 300 (absence d'hyperthermie pendant cette période). Même légende que pour la figure 27.

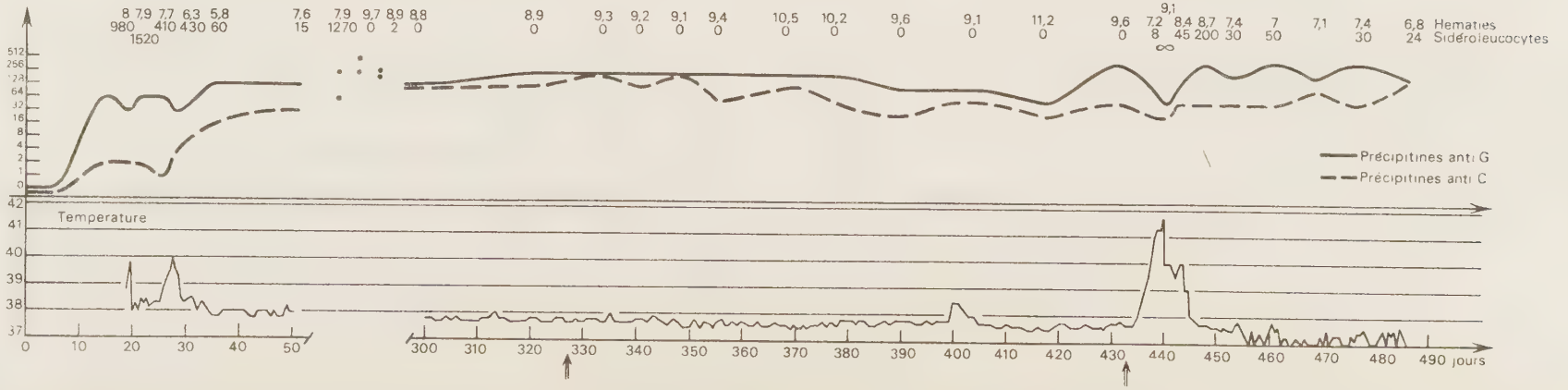


figure 65 : Cheval Le Fortuné infecté dans les conditions naturelles par une souche française de virus AIE puis par la souche Wyoming. Même légende que pour la figure 27.

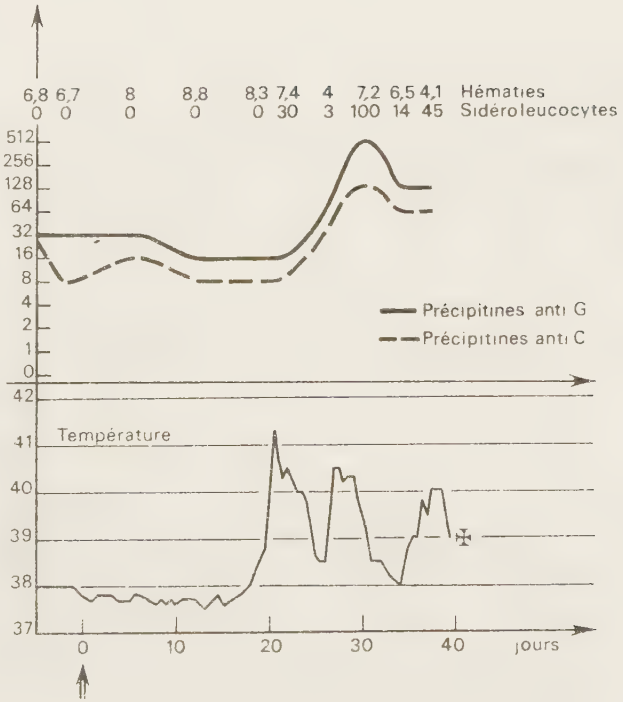
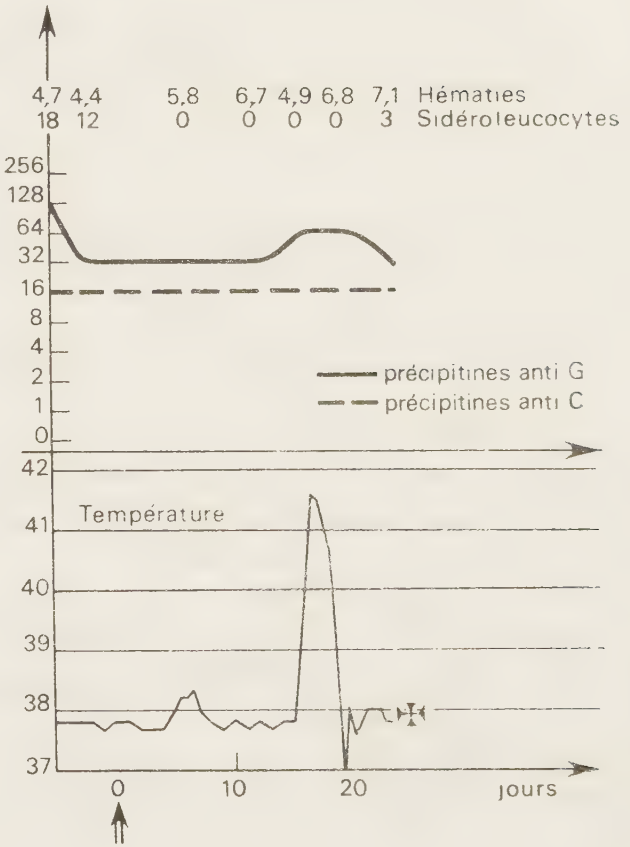


figure 66 : Jument Uvéa infectée dans les conditions naturelles par une souche française de virus AIE puis par la souche Wyoming. Même légende que pour la figure 27.



infection, peut être résumé en classant les animaux par ordre décroissant d'ancienneté d'infection.

Equidés	Délai séparant les deux infections	Comportement après l'épreuve
Sy	2735 jours environ	Résistant
Solitaire	2555 jours	Résistant
Uvéa	610 jours environ	Sensible
Le Fortuné	550 jours au moins	Sensible
Tinamite	489 jours	Sensible
Retz	330 jours environ	Résistant
Retzquilleur	197 jours	Sensible
Leticia	194 jours	Sensible
Vril	193 jours	Sensible

Il n'est pas possible de dégager de ces données une conclusion valable quant à l'existence d'une relation entre l'immunité et l'ancienneté de l'infection.

2) Epreuve, par une souche française, d'équidés infectés par la souche Wyoming

Nous n'évoquerons, dans ce cadre, que les équidés antérieurement infectés une seule fois par la souche Wyoming.

Il s'agit de deux équidés (Tétu et Pasteur) expérimentalement infectés par la souche Wyoming, puis éprouvés par la souche française Alfort Retz (correspondant au cheval Retz et au poney Retzquilleur).

Le tableau XXVI et les figures 67 et 68 rendent compte des résultats obtenus.

Il serait hasardeux de tirer des conclusions des résultats de l'épreuve du cheval Pasteur. L'apparition d'une fébricule 48 heures après l'épreuve, et d'un taux élevé de sidéroleucocytes (890 pour 100.000 leucocytes) sont à considérer avec réserve. Il est en effet difficile de rapporter avec certitude l'augmentation du taux des sidéroleucocytes à l'épreuve, car, 35 jours avant celle-ci, le cheval était en crise et possédait 720 sidéroleucocytes pour 100.000 leucocytes. L'épreuve du cheval Pasteur a été réalisée trop précocement.

.../..

TABLEAU XXVI : Résultats de l'épreuve virulente par une souche française de virus AIE d'équidés déjà infectés par la souche Wyoming.

Equidé	Première souche virale	Maladie observée	Durée de la guérison apparente avant l'inoculation	Délai séparant les deux infections	Deuxième souche virale	Résultat de la seconde inoculation
Tétu	Inoculation par voie intradermique de 0,1 ml de virus souche Wyoming (Edelweiss du 9-2-71)	AIE subaiguë (temp. max. 39°5C) du jour 10 au jour 40	42 jours	84 jours	Inoculation par voie intradermique et sous-cutanée de 5 ml d'une souche française Alfort Retz (22-3-73)	Hyperthermie modérée (temp. max. 39°2C) au 10ème jour
Pasteur	Inoculation par voie veineuse de 220 ml de virus souche Wyoming (sérum Fanny 10-11-72 et sang Rock 12-12-72)	AIE aiguë (4 crises en 3 mois)	35 jours	121 jours	Inoculation par voie intra dermique et sous-cutanée de 10 ml d'une souche française Alfort Retz (22-3-73)	Réaction fébrile modérée (39°) 48 h après

figure 67 : Poney Tétu infecté par la souche Wyoming puis par une souche française au jour 84. Même légende que pour la figure 27.

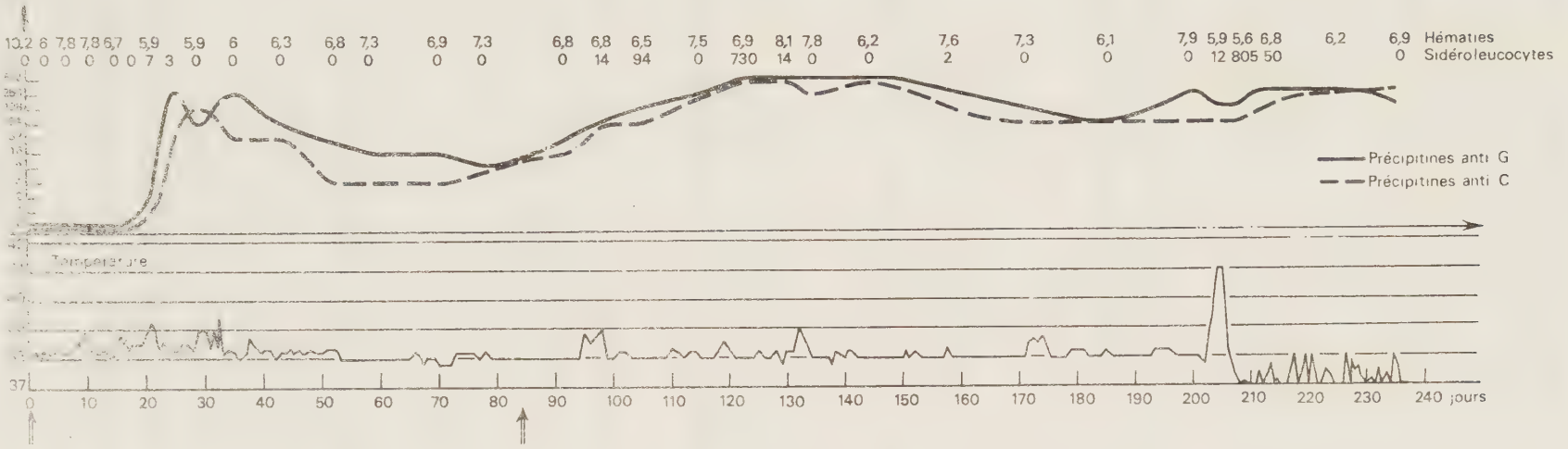
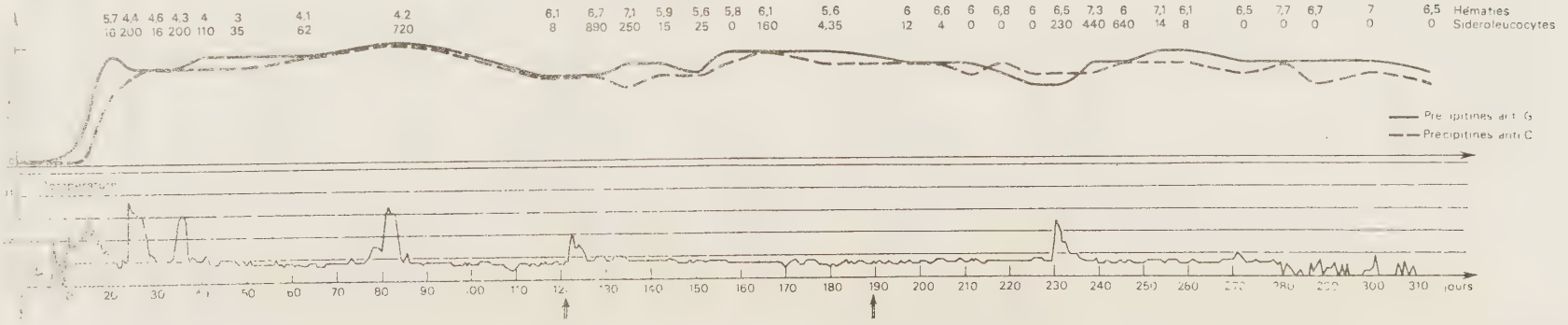


figure 68 : Cheval Pasteur ayant reçu 3 injections de virus AIE (dans l'ordre, souche Wyoming, souche française et souche Wyoming). Même légende que pour la figure 27.



En revanche, on peut, plus valablement, étudier les résultats de l'épreuve du poney Tétu. Chez cet animal, 7 examens sanguins étalés au cours des 55 jours précédant l'épreuve avaient confirmé l'absence de sidéroleucocyte. De même, le taux des précipitines anti G et anti C décroissait lentement au cours de cette période pour atteindre seulement 1/8. Dix jours après l'épreuve, une hyperthermie modérée est apparue, accompagnée de sidéroleucocytes atteignant un maximum de 730, 35 jours après l'épreuve, et d'une augmentation des précipitines anti G et anti C dont le titre monte à 1/512, 39 jours après l'épreuve (figure 67).

Ces résultats peuvent être interprétés comme les témoins d'une absence d'immunité, contre la souche française de virus AIE, du poney Tétu infecté par la souche Wyoming.

Ultérieurement, le poney Tétu a reçu une inoculation de virus AIE, souche française (Maschietta) différente de la précédente. L'évolution de l'infection est représentée sur la figure 69.

Le comportement d'équidés infectés par une souche de virus AIE, lors de réinoculation par une autre souche, varie donc de la sensibilité complète à la résistance totale.

3) Epreuve, par la souche Wyoming, d'équidés déjà infectés par la souche Wyoming

La souche Wyoming utilisée pour l'épreuve provenait soit d'un animal différent de celui ayant fourni la souche infectante initiale, soit du même animal, mais à une date différente de prélèvement.

Les différents inoculums utilisés pour les 4 chevaux de cette expérience sont mentionnés dans le tableau XXVII.

a) Infection par la souche Wyoming provenant d'un autre cheval

Quatre équidés déjà infectés une fois par la souche Wyoming (Bianco), ou par une souche française et la souche Wyoming (Pasteur, Sy et Retz), ont été soumis à l'inoculation de sérum virulent provenant d'un autre cheval que celui ayant fourni le sérum infectant antérieur. Les antécédents de ces équidés et le résultat de la réinoculation de la souche Wyoming sont portés dans le tableau XXVIII et la figure 70.

On constate sur ces documents la diversité de la réponse des équidés à l'épreuve virulente.

.../..

TABLEAU XXVII : Nature des prélèvements utilisés pour l'infection et les réinfections.

Equidé	Infection initiale	Deuxième infection	Troisième infection	Quatrième infection	Cinquième infection
Bianco	Wyoming (Edelweiss)	Wyoming (Géronimo 18.1.74)	Wyoming (Géronimo 26.3.74)	Wyoming (Eden 30.1.75)	
Retz	Souche Française	Wyoming (Mélanose 31.8.73)	Wyoming (Géronimo 18.1.74)	Wyoming (Géronimo 30.11.73)	
Sy	Souche Française	Wyoming (Mélanose 31.8.73)	Wyoming (Géronimo 18.1.74)	Wyoming (Géronimo 26.3.74)	Wyoming (Eden 30.1.75)
Pasteur	Wyoming (Fanny et Rock)	Souche Française (Retz)	Wyoming (Géronimo 18.1.74)	Wyoming (Géronimo 26.3.74)	Wyoming (Eden 30.1.75)

. Chez le poney Bianco, on n'a enregistré aucune élévation de la température avant le 100ème jour suivant l'épreuve. L'augmentation des sidéroleucocytes pourrait être rapportée à l'inoculation (figure 71).

. Chez le cheval Sy, la température n'a atteint que 39°C pendant deux jours, 32 jours après l'épreuve et le taux des sidéroleucocytes ne s'est pas modifié de façon significative (figure 63).

. Le cheval Pasteur a présenté une crise d'AIE 40 jours après l'épreuve, accompagnée d'une augmentation des sidéroleucocytes. On peut penser que cette crise est la conséquence de l'inoculation, mais la présence de 435 sidéroleucocytes pour 100.000 leucocytes, 10 jours avant l'épreuve, incite à la prudence (figure 68).

. Enfin, le cheval Retz s'est montré pleinement réceptif à l'épreuve virulente. Indemne de sidéroleucocytes et apparemment normal depuis plusieurs mois, il a réagi très rapidement à l'inoculation par une forte hyperthermie (température supérieure à 41°C) accompagnée de l'ensemble

.../..

TABLEAU XXVIII : Modalités expérimentales de la réinoculation de la souche Wyoming à des équidés déjà infectés par cette souche mais provenant d'un animal différent.

Equidé	Infection initiale	Seconde infection	Troisième infection	Résultat de la nouvelle infection par la souche Wyoming
Sy	Spontanée (souche française)	Wyoming (Mélanose 31.8.73)	Wyoming (Géronimo 18.1.74)	Fébricule 32 jours après l'épreuve
Retz	Spontanée (souche française)	Wyoming (Mélanose 31.8.73)	Wyoming (Géronimo 18.1.74)	Crise aiguë d'AIE le 4ème jour après l'épreuve
Pasteur	Wyoming (Fanny + Rock)	Française Alfort Retz	Wyoming (Géronimo 18.1.74)	Crise d'AIE 40 jours après l'épreuve
Bianco	Wyoming (Edelweiss)	Wyoming (Géronimo 18.1)	Absence de réaction thermique - Augmentation des sidéroleucocytes	

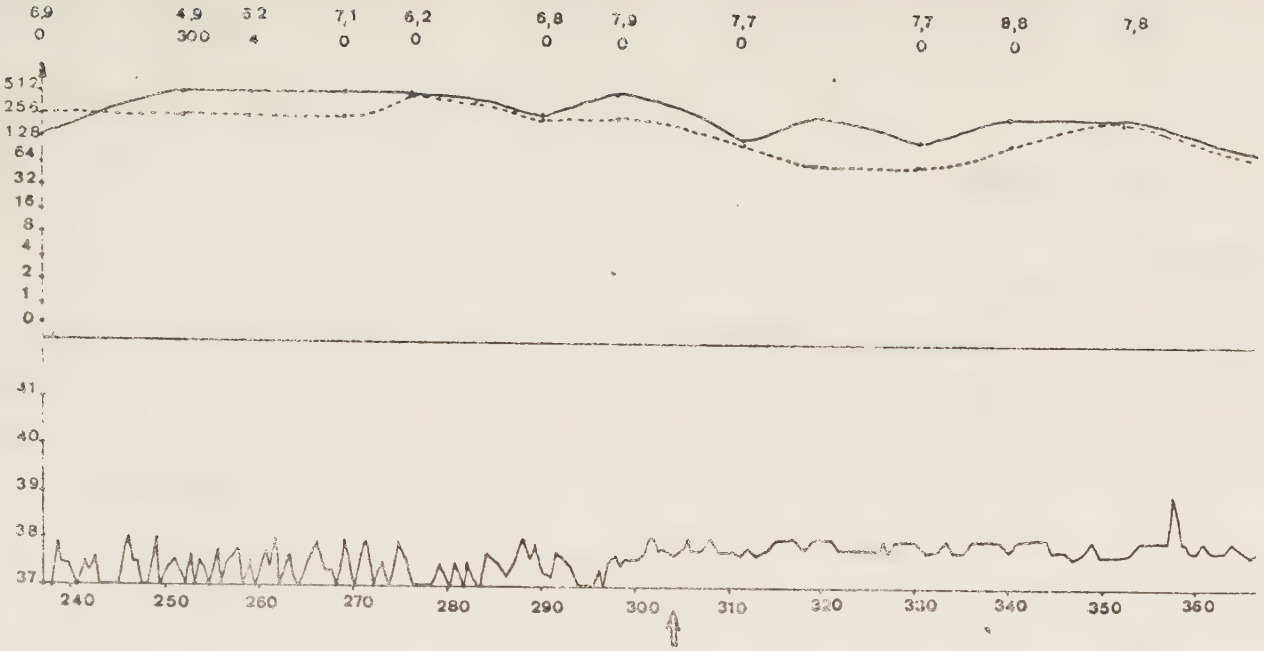


figure 69 : Résultat de l'inoculation au poney Tétu de la souche Wyoming de virus AIE au jour 304. Ce poney avait antérieurement été infecté par la souche Wyoming (Jour 0) et par une souche française (Jour 84) (cf figure 67).

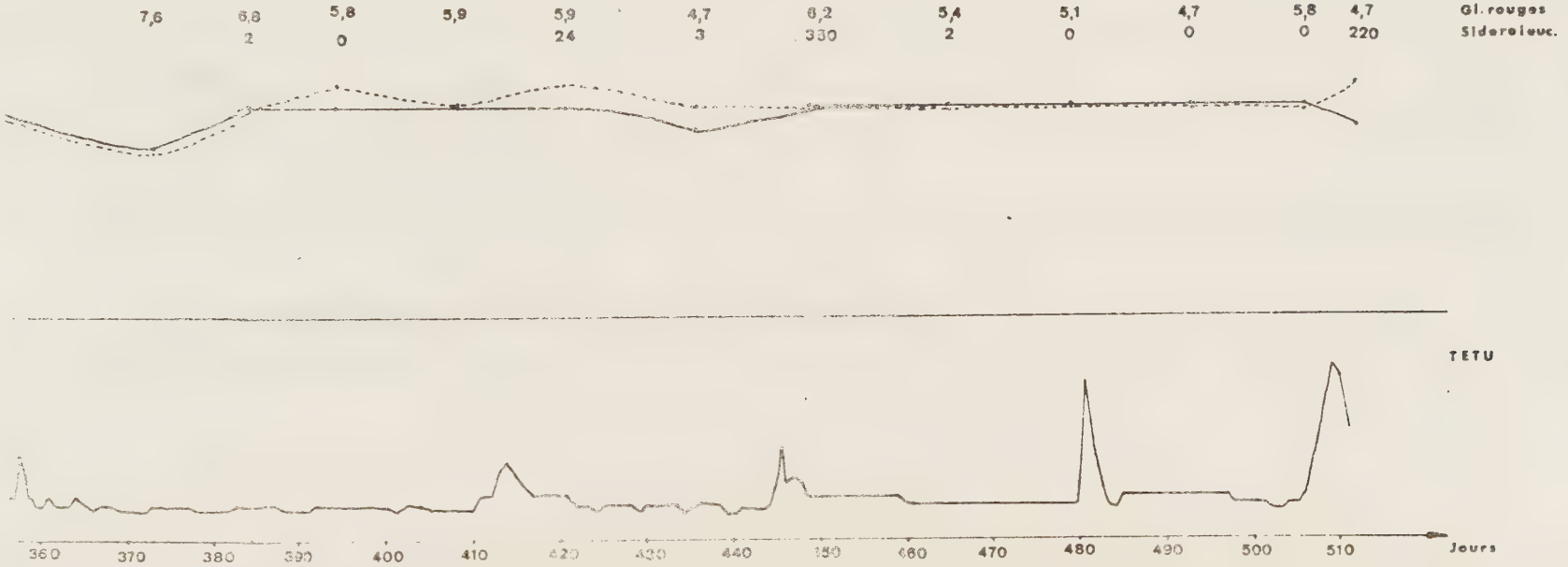


figure 70 : Représentation schématique du comportement des équidés déjà infectés par la souche Wyoming mais d'origine différente du prélèvement d'épreuve (Géronimo 18.1.74).

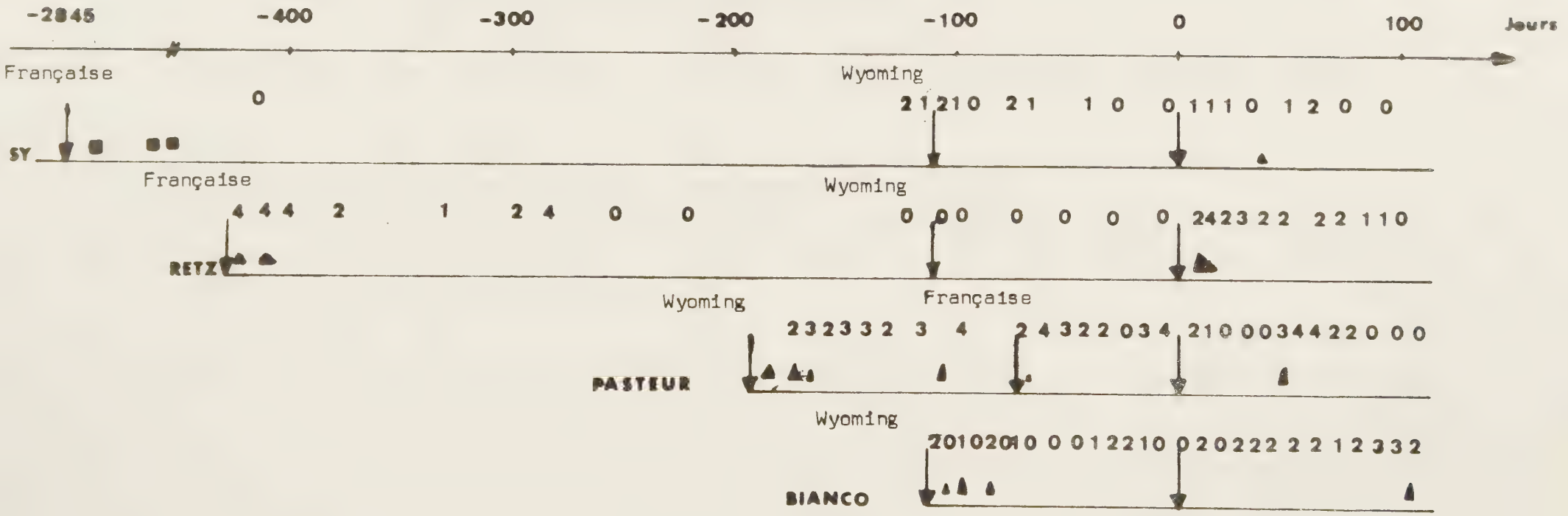
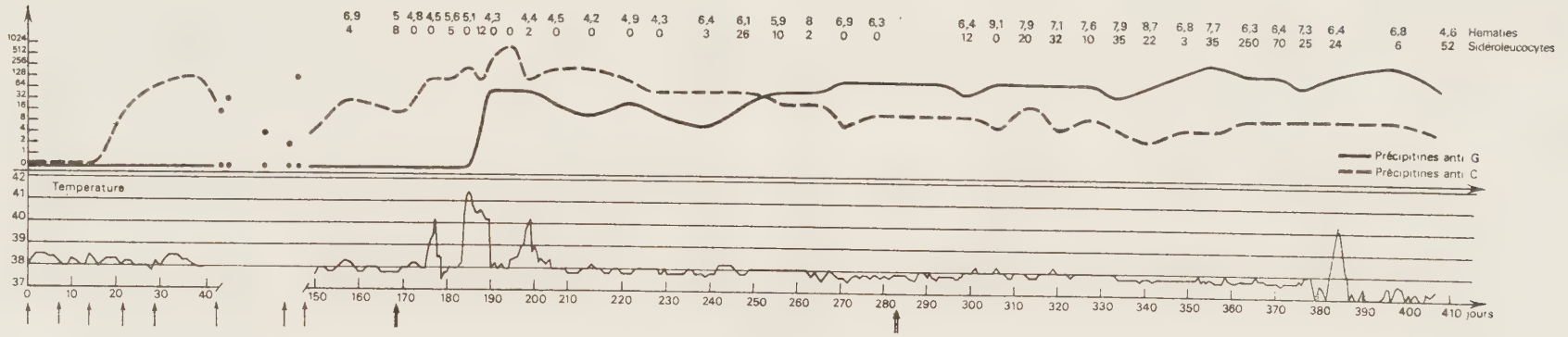


figure 71 : Poney Bianco ayant reçu plusieurs injections du précipitogène C puis deux injections de virus AIE souche Wyoming. Même légende que pour la figure 27.



des signes d'une crise d'AIE aiguë faisant redouter une issue fatale, d'une augmentation importante des sidéroleucocytes et d'une diminution progressive de plus de 2 millions d'hématies par mm3 (figure 64).
Or antérieurement, le cheval Retz s'était montré totalement résistant à une première infection par la souche Wyoming ! (figure 64)

En résumé, ces résultats témoignent :

- *de la diversité de comportement d'équidés déjà infectés par la souche Wyoming, lors de l'injection d'un prélèvement contenant la souche Wyoming, d'origine animale différente,*
- *de la diversité du comportement pour un même équidé (Retz) soumis à ce protocole,*
- *de l'entière sensibilité parfois constatée lors de l'injection de la souche Wyoming de virus AIE, à des chevaux déjà infectés par cette souche (Retz).*

b) Infections successives par la souche Wyoming provenant d'un même cheval

Quatre équidés déjà infectés par la souche Wyoming provenant du poney Géronimo ont été soumis à une nouvelle injection de sérum virulent prélevé chez Géronimo à une date différente. Au cours d'une période de 140 jours, le poney Géronimo a présenté 8 crises d'AIE espacées de quelques jours ou de quelques semaines (figure 43).

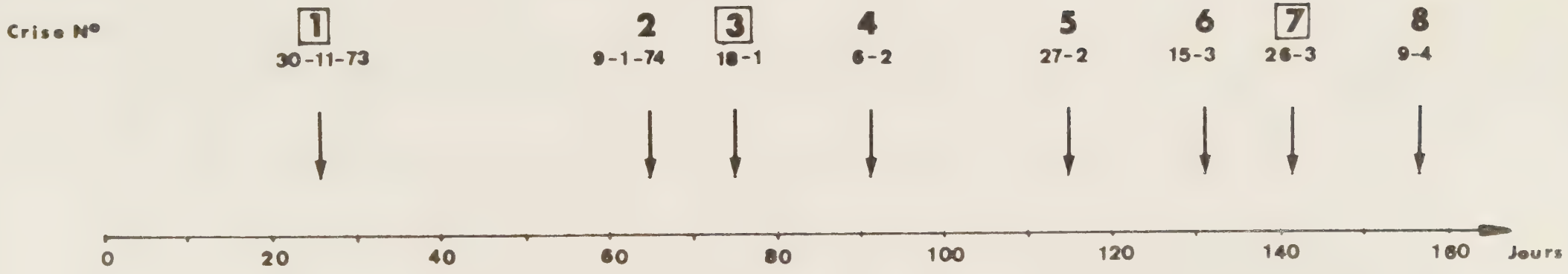
Les prélèvements utilisés correspondent aux crises n° 1, 3 et 7 (figure 72).

Les quatre équidés les ont reçus dans l'ordre suivant :
Bianco, Pasteur et Sy : crise n° 3 puis crise n° 7 ;
Retz : crise n° 3 puis crise n° 1.

Dans les semaines suivant la deuxième inoculation, aucun de ces équidés n'a présenté de réaction fébrile, d'augmentation des sidéroleucocytes ou des titres de précipitines anti G et anti C (figures 73 à 76). Et pourtant, le prélèvement correspondant à la crise n° 7 était bien virulent et capable d'entrainer la mort, puisque le poney Sassy, non antérieurement infecté et qui l'a reçu dans les mêmes conditions que Bianco, Pasteur et Sy, est mort le 30ème jour suivant l'inoculation, après avoir présenté une AIE aiguë (figure 28).

.../..

figure 72 : Représentation schématique de la succession des 8 crises d'AIE enregistrées chez le poney Géronimo au cours des mois suivant son infection par la souche Wyoming (Edelweiss) au jour 0. Les prélèvements utilisés pour infecter d'autres équidés sont placés dans un carré.



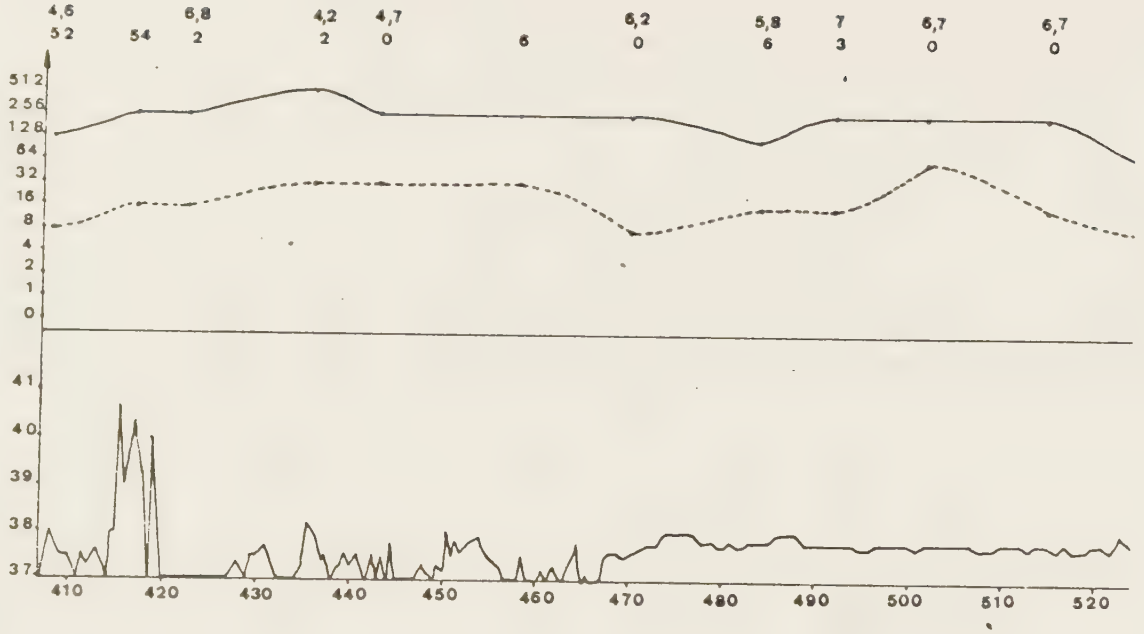
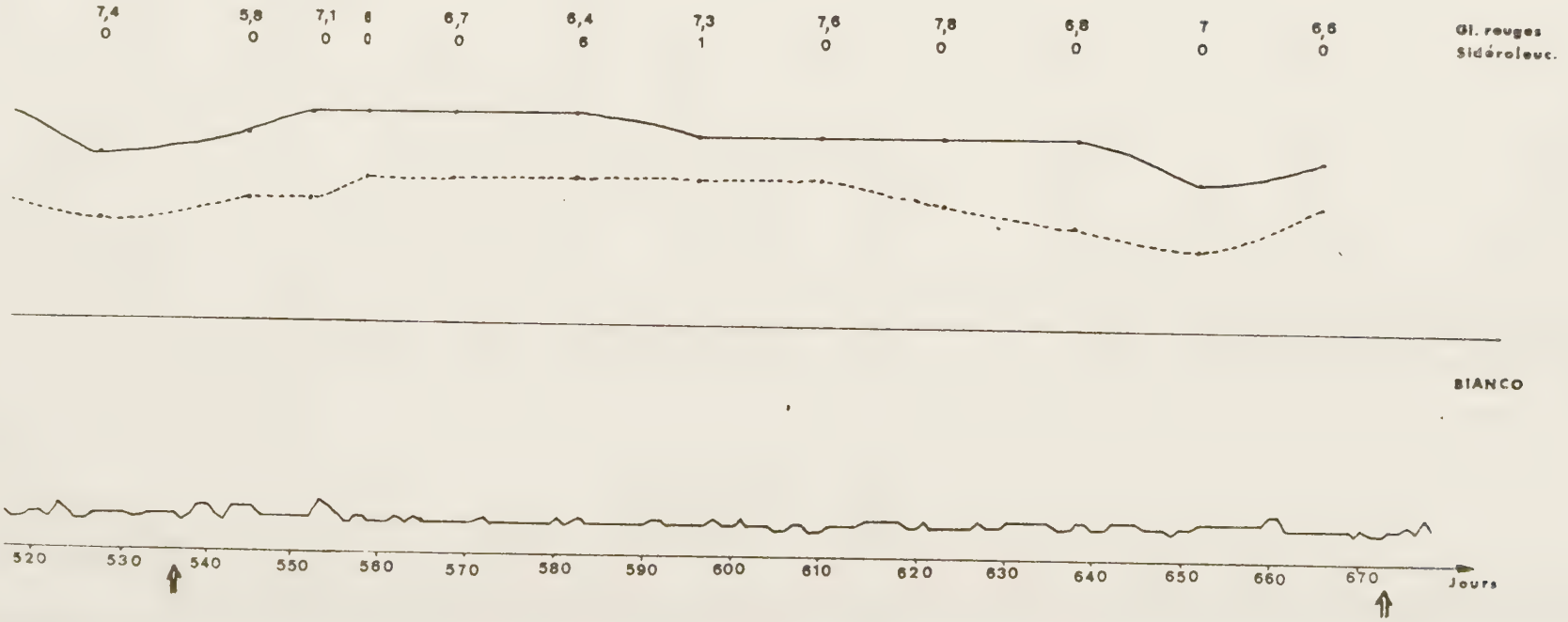


figure 73 : Résultat des réinoculations de la souche Wyoming au poney Bianco déjà infecté par la souche Wyoming (cf figure 45).

Jour 169 : Wyoming Edelweiss
Jour 283 : Wyoming Géronimo crise 3
Jour 536 : Wyoming Géronimo crise 7
Jour 673 : Wyoming Eden



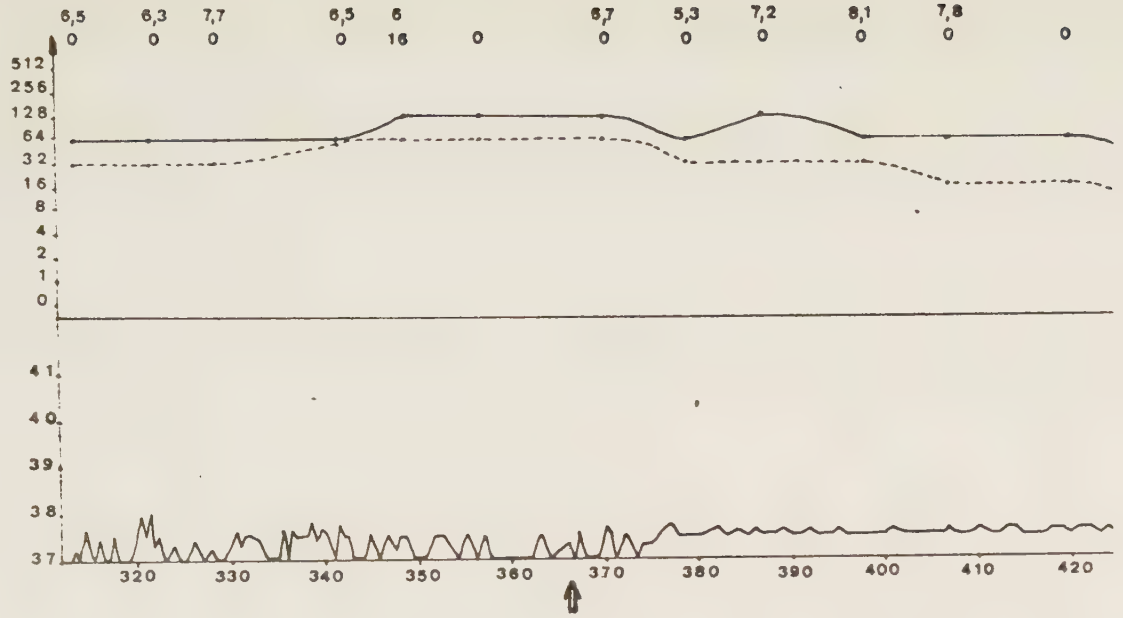
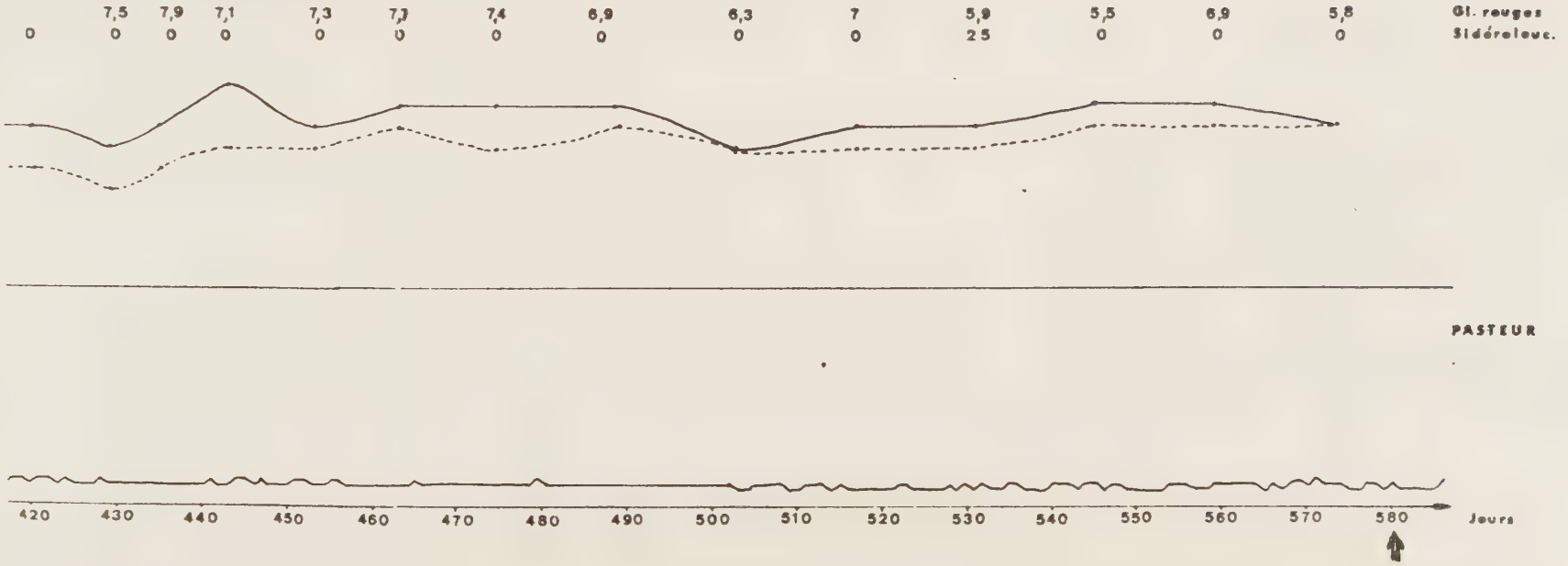


figure 74 : Résultat de la réinoculation de la souche Wyoming au cheval Pasteur déjà infecté par la souche Wyoming (cf figure 68).

Jour 0 : Wyoming Fanny et Rock
Jour 121 : Souche Alfort Retz
Jour 189 : Wyoming Géronimo crise 3
Jour 366 : Wyoming Géronimo crise 7
Jour 580 : Wyoming Eden



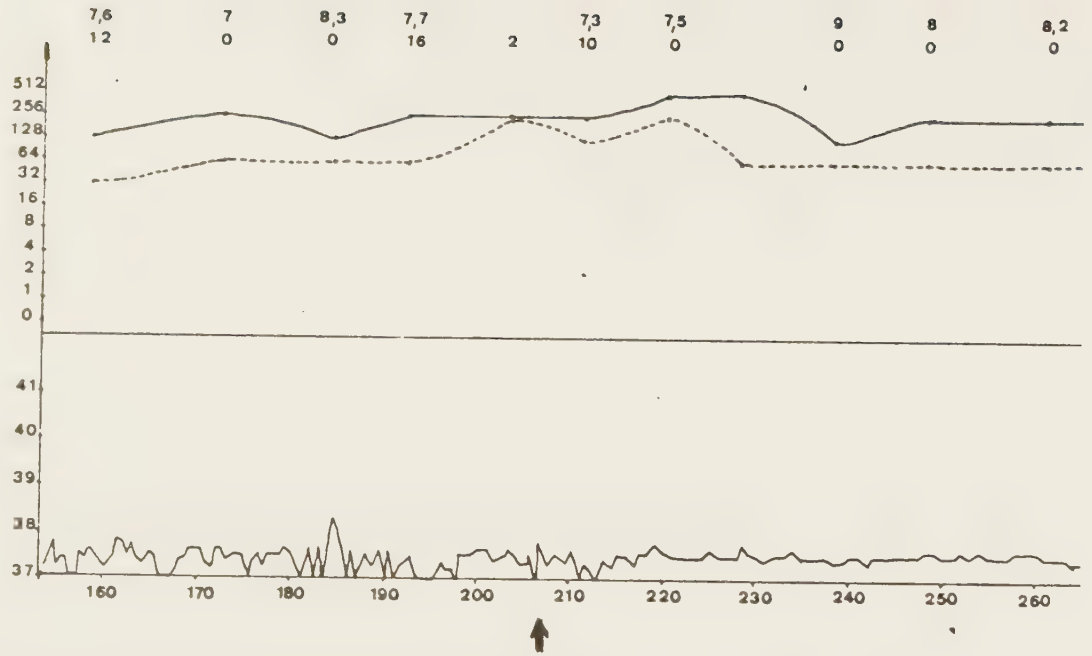
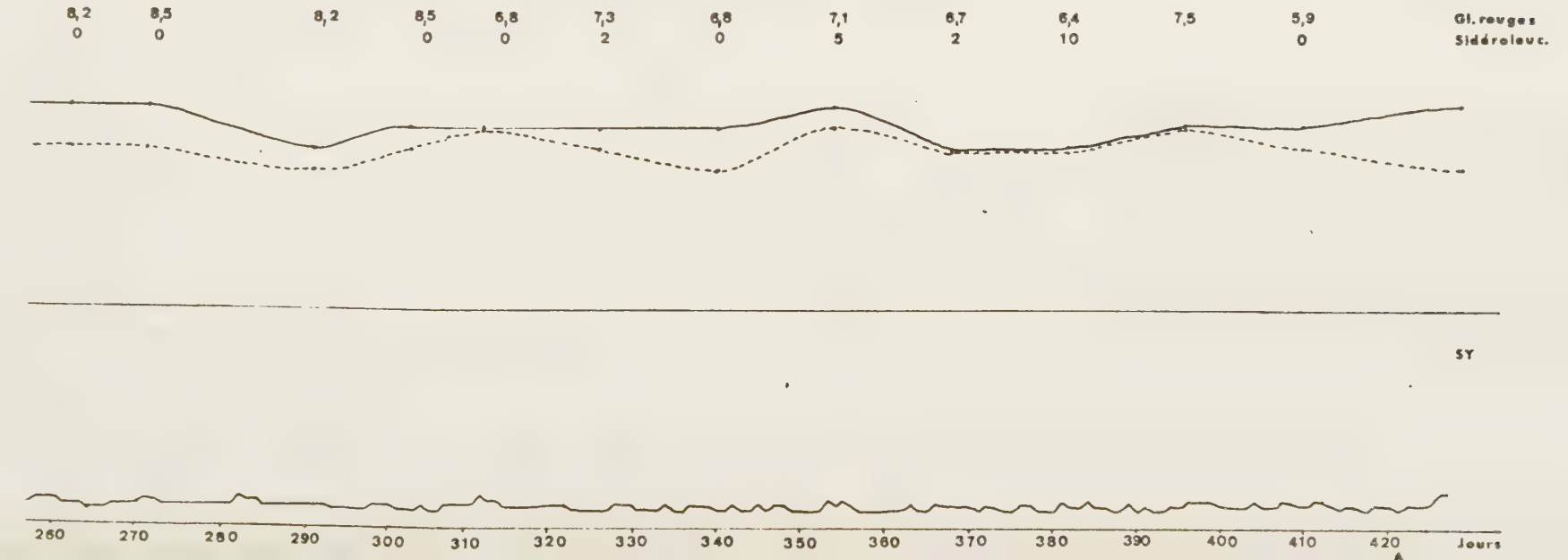


figure 75 : Résultat de la réinoculation de la souche Wyoming au cheval Sy déjà infecté par la souche Wyoming (cf figure 63).

Jour - 2735 : Souche française
Jour 0 : Wyoming Mélanose
Jour 98 : Wyoming Géronimo crise 3
Jour 206 : Wyoming Géronimo crise 7
Jour 421 : Wyoming Eden



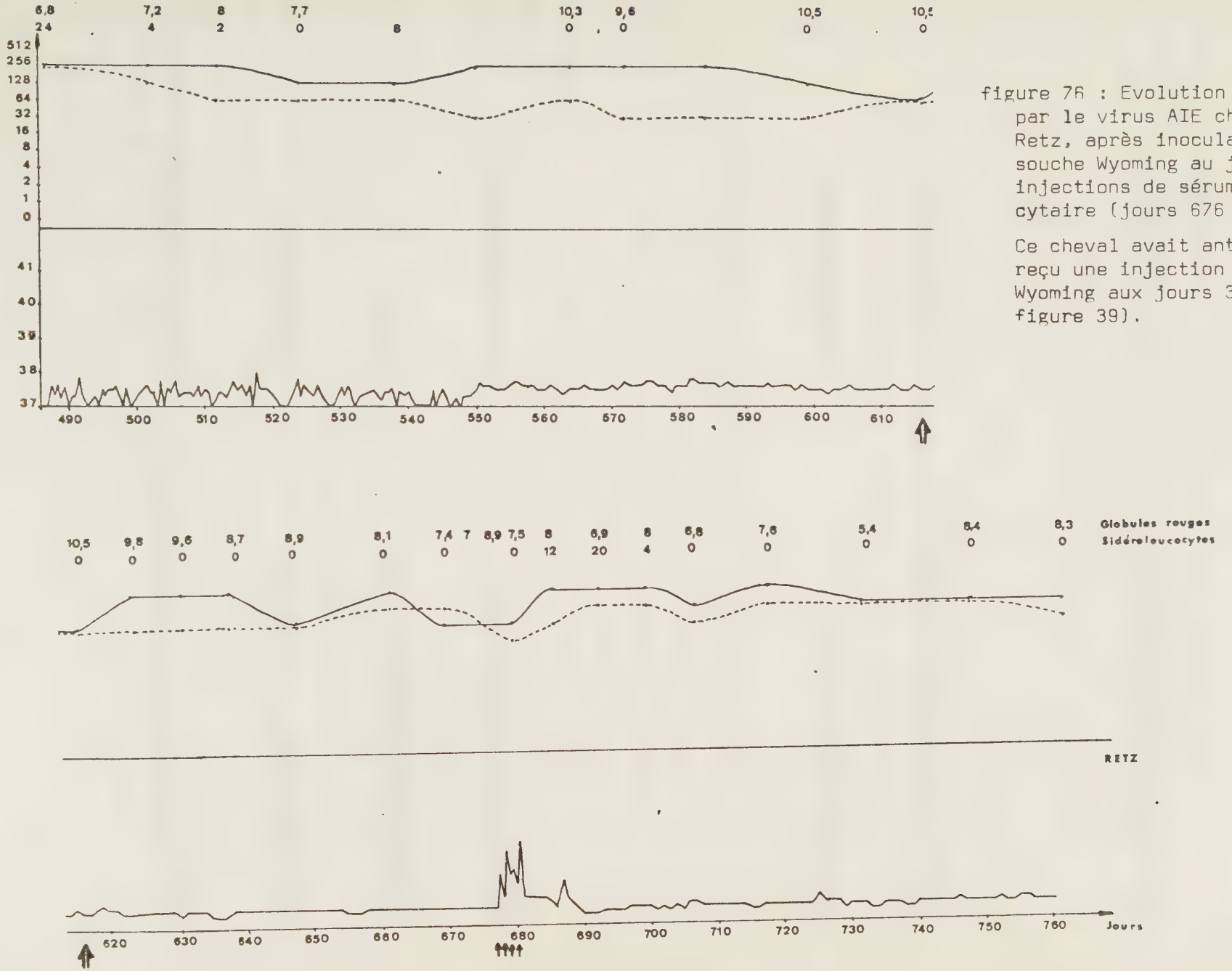


figure 76 : Evolution de l'infection par le virus AIE chez le cheval Retz, après inoculation par la souche Wyoming au jour 615 et 4 injections de sérum anti lymphocytaire (jours 676 à 680).

Ce cheval avait antérieurement reçu une injection de virus souche Wyoming aux jours 327 et 433 (cf figure 39).

Ainsi, les 4 équidés utilisés dans cette expérience se montrent résistants à la réinoculation de la souche Wyoming prélevée à un moment différent, chez le même équidé.

Pour le cheval Retz, le résultat peut se comprendre dans la mesure où la spécificité antigénique du virus d'épreuve (crise n° 1) est sans doute identique à celle du virus ayant servi à l'infection du poney Géronimo (Edelweiss), lui-même sans doute identique au virus Wyoming déjà utilisé pour infecter Retz (Mélanose du 31.8.73).

Pour les 3 autres équidés, si la spécificité antigénique des virus des crises n° 3 et 7 est bien différente, comme l'indique KONO, on aurait pu s'attendre à ne pas rencontrer une résistance complète. L'existence d'infections antérieures, l'ancienneté de l'infection initiale, une résistance cellulaire ou un autre facteur qui nous échappe peut être à l'origine de ces résultats.

C/ Equidé infecté et traité par du sérum antilymphocytaire

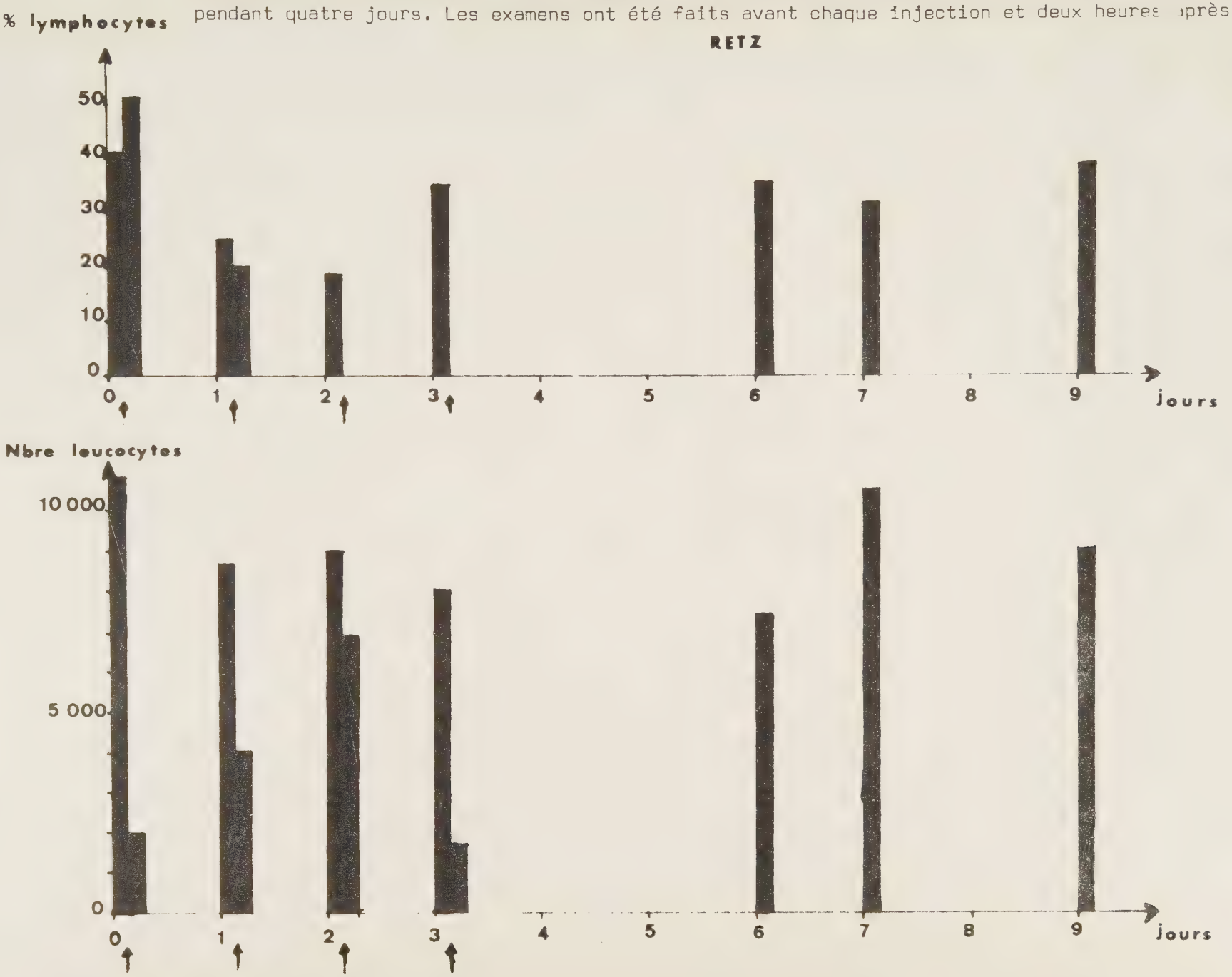
Le rôle des lymphocytes dans la résistance d'équidés infectés par une souche de virus AIE a été étudié en soumettant le cheval Retz à des injections de gamma globulines antilymphocytes de cheval, préparées sur mouton et purifiées (cf. techniques).

125 ml de gamma globulines antilymphocytes de cheval, de titre 1/160 en lymphotoxicité, sont injectées 4 fois, à 24 heures d'intervalle, lentement, par voie veineuse. Après l'injection, le cheval est inquiet, atteint de petites coliques, se couche et se relève, mais sans que ces signes n'accèdent à un degré inquiétant.

Un prélèvement de sang est effectué au moment de l'injection et un autre deux heures après. Sur ces échantillons, on établit la formule sanguine et on réalise la numération des globules rouges et des globules blancs. L'évolution du nombre de leucocytes et du pourcentage de lymphocytes pendant cette période est représentée sur la figure 77. On y constate que le nombre des leucocytes chute fortement à la suite de l'injection des gamma globulines (de 10.900 à 1.950 pour la première injection), cette diminution allant en décroissant avec la 2ème et la 3ème injection. De même, le pourcentage de lymphocytes diminue 24 heures et 48 heures après la première injection. Au bout de quelques jours, les valeurs initiales sont de nouveau atteintes.

.../..

figure 77 : Représentation schématique de l'évolution du nombre de leucocytes par mm3 et du pourcentage de lymphocytes chez le cheval "Retz" soumis à 1 injection quotidienne de 125 ml de sérum antilymphocytaire pendant quatre jours. Les examens ont été faits avant chaque injection et deux heures après.



La température de Retz augmente un peu après les injections (figure 76) mais seulement de façon passagère et à cause de l'injection de protéines étrangères. Aucune élévation thermique retardée n'est notée ; de même, les sidéroleucocytes ne montrent guère de variation.

Il faut donc reconnaitre que l'administration de 500 ml de gamma globulines antilymphocytes de cheval, d'activité indéniable, prouvée d'ailleurs par l'évolution des lymphocytes de Retz, n'a pas modifié la résistance de ce cheval vis-à-vis du virus AIE dont il est porteur.

Quatrième partie :

DISCUSSION GENERALE

I - LES PRECIPITOGENES AIE

A/ Le précipitogène G

1) Production

a) Organes d'équidés infectés

. Le précipitogène G est présent dans la rate de la plupart des équidés utilisés en vue de la production d'antigène AIE. Dans notre étude, il a été mis en évidence dans la rate de 23 équidés sur les 25 sacrifiés ou morts. Cependant, il ne s'y trouve parfois qu'en quantité faible, insuffisante pour obtenir une solution antigénique utilisable dans le diagnostic de l'AIE par immunodiffusion en gélose ou pour la recherche. Ainsi, sur les 23 rates, 6 ont fourni un extrait d'activité réduite. Par suite, 17 rates seulement sur 25 (soit 68 p. cent) ont été retenues.

Ce pourcentage d'équidés infectés par le virus AIE et fournissant un extrait splénique satisfaisant pour le test d'immunodiffusion en gélose, n'est guère différent de ceux obtenus par d'autres Auteurs :

17 p. cent (2 sur 12) pour HENSON et coll. (1971)
37 p. cent (9 sur 24) pour BOULANGER et coll. (1972)
51 p. cent (17 sur 33) pour COGGINS (1972)
54 p. cent (12 sur 22) pour MORGAN (1972)

. D'une façon générale, le précipitogène G se trouve en quantité plus importante dans la rate que le précipitogène C. Ceci est à l'origine du délai qui a séparé la mise en évidence de l'un (COGGINS et NORCROSS, 1970) et de l'autre (TOMA et GORET, 1973). Dans la rate d'un seul équidé sur 23, le précipitogène G était en quantité inférieure par rapport au précipitogène C. Cette différence ne peut être rapportée à la souche virale employée puisque le même inoculum a provoqué chez un poney, quelques jours auparavant, la réponse habituelle, c'est-à-dire une prédominance de G. Elle est plus vraisemblablement liée à la différence de date d'abattage de ces deux poneys et à une cinétique différente d'apparition des précipitogènes G et C au cours de l'infection. Cette hypothèse est confirmée par les résultats obtenus sur un poney qui a produit des précipitines anti G, témoins de la présence de l'antigène G, et chez lequel on a pu mettre en évidence le précipitogène C, seulement plusieurs mois après, en l'absence de précipitines correspondantes.

Il est cependant difficile de comprendre comment un délai de plusieurs mois peut séparer la synthèse des deux précipitogènes associés dans la particule virale.

.../..

Chez certains équidés, la présence du précipitogène G peut être démontrée dès le 5ème jour qui suit l'inoculation. A l'inverse, on peut ne le retrouver qu'après des délais relativement longs. La présence de précipitines anti G dans le sérum n'empêche pas forcément la révélation du précipitogène G dans la rate. Il est vraisemblable que cette coexistence s'explique par le fait que le précipitogène G, constituant interne du virion, est normalement inaccessible aux précipitines sériques anti G et qu'il n'est dégagé qu'à l'occasion de la préparation de l'extrait tissulaire. Pourtant, BOULANGER et coll. (1972) n'ont pas constaté d'activité antigénique dans les extraits spléniques de chevaux morts ou sacrifiés 16 à 22 jours après l'inoculation.

. L'emploi d'une technique d'immunodiffusion radiale est indispensable pour apprécier correctement la concentration du précipitogène G dans les extraits spléniques. Elle a été utilisée par BOULANGER et coll. (1971) ainsi que par MALMQUIST et coll. (1973). Nous l'avons appliquée à l'étude comparée de l'activité des solutions antigéniques préparées à Alfort ou reçues de différents pays.

Une analyse des différents paramètres pouvant conditionner la valeur antigénique des extraits produits à partir des divers équidés n'a pas permis de dégager un facteur essentiel.

Les diverses espèces d'équidés se prêtent pareillement à l'inoculation en vue de la préparation d'antigène G. Nous avons montré, en particulier, que l'âne, qui ne semble pas avoir été employé par d'autres Auteurs, peut fournir de bons résultats. L'un d'eux s'est même révélé, de loin, le meilleur "producteur" de précipitogène G parmi tous nos équidés.

Comme la plupart des autres Auteurs, nous avons utilisé presque exclusivement la souche Wyoming pour l'inoculation des équidés, en raison de sa virulence élevée. L'emploi simultané de dexaméthasone n'a pas augmenté la synthèse du précipitogène.

Les équidés ayant présenté une forte fièvre après l'inoculation du virus AIE nous ont fourni, dans l'ensemble, des préparations antigéniques plus puissantes que celles provenant d'animaux ayant faiblement réagi sur le plan thermique. Cependant, comme l'ont noté HENSON et coll. (1971) et BOULANGER et coll. (1972), cette relation n'est pas constante et des chevaux dont la température a dépassé 40°C peuvent se révéler mauvais producteurs d'antigène. Ceci amène à reconsidérer l'opportunité d'une décision d'abattage en fonction de l'évolution de la fièvre. Il nous parait préférable de sacrifier l'équidé au 7ème ou 8ème jour après l'inoculation, même en

.../..

l'absence d'une évolution thermique importante, plutôt que d'attendre un éventuel clocher thermique et de sacrifier tardivement, vers le 11ème ou 12ème jour.

Une sensibilité individuelle (non liée à l'âge, au sexe et à l'espèce) et, par suite, impossible à prévoir, semble conditionner le développement viral chez les équidés infectés. Pour cette raison, ainsi qu'à cause du prix de revient élevé des équidés et de la richesse en protéines de la solution de précipitogène G d'origine splénique, la préparation à partir des cultures cellulaires est appelée à remplacer la production *in vivo* d'antigène G destiné au diagnostic de l'AIE ou à la recherche. L'extraction à partir de la rate d'équidé sera maintenue dans les laboratoires ne disposant pas de moyens de production en grande quantité de lignées cellulaires chroniquement infectées par le virus AIE.

L'activité antigénique des solutions utilisables de précipitogène G que nous avons étudiées varie du simple au décuple (de 30 environ à plus de 300 dans notre système dépendant d'un antigène G de référence). Les deux préparations les plus actives ont été celle d'un âne (activité : 350) et celle d'un extrait envoyé par CESAR LORA (activité : 302). Tous les autres antigènes d'origine splénique produits à Alfort ou reçus de l'étranger possédaient une activité inférieure à 100.

. Nous avons étudié le rendement comparé de deux techniques d'extraction du précipitogène G à partir de la rate : la technique reposant sur des cycles de congélation décongélation et celle faisant appel à l'éther (NAKAJIMA et coll., 1973).

Nous n'avons pas trouvé de différence significative pour la quantité d'antigène récupérée par l'une ou l'autre technique. Compte tenu des problèmes soulevés par l'élimination ultérieure de l'éther, il ne nous semble pas que la technique d'extraction à l'éther soit à préférer.

. Nous avons enfin montré que le précipitogène G est souvent présent dans d'autres organes que la rate : poumons, reins, foie, ganglions lymphatiques, thymus, coeur (TOMA et GORET, 1973). NAKAJIMA et coll. (1973) ont obtenu des résultats voisins sur un cheval qui leur a permis d'extraire le précipitogène G à partir du foie, du poumon, de la moelle osseuse et du sérum.

b) Culture cellulaire

Le précipitogène G a été produit en culture cellulaire de la lignée E.D. infectée chroniquement ou récemment. Les meilleurs résultats ont été obtenus

.../..

avec les cellules chroniquement infectées fournies par MALMQUIST.

L'activité en immunodiffusion radiale a atteint 300, avec une faible concentration en protéines. Des échantillons préparés à partir de cellules E.D. ou de leucocytes infectés, reçus à Alfort, ont fourni des résultats voisins ; 210 pour l'antigène de NAKAJIMA ; 108 pour l'antigène de PEARSON.

L'un des avantages de cette production est la pauvreté de la solution antigénique en protéines, par rapport à une solution de précipitogène d'origine splénique d'activité égale. Ceci est appréciable pour le diagnostic de l'AIE, en raison de l'élimination de précipités non spécifiques de l'AIE rencontrés avec certains sérums, et pour l'étude des propriétés du précipitogène G, étant donné la plus grande pureté du produit de départ.

Un autre avantage réside dans le fait que l'on peut se dispenser de recourir au cheval et qu'il devient possible de produire du précipitogène en permanence, ou à volonté, à partir de cellules conservées dans l'azote liquide. Ces avantages amèneront sans doute à abandonner les cultures de leucocytes comme support cellulaire en vue de la production du précipitogène G.

2) Isolement et purification

La mise au point d'une technique de titrage du précipitogène G était indispensable pour étudier le rendement et la purification correspondant à chaque étape d'une série de techniques. Nous avons retenu l'immunodiffusion radiale. Aucune autre étude fournissant des résultats de rendement et de purification du précipitogène G n'est parue.

La précipitation par le sulfate d'ammonium permet de séparer de manière pratique et efficace les deux précipitogènes du virus AIE. Le rendement est assez bon puisque l'on retrouve de 45 à 90 p. cent de l'activité du précipitogène G dans la fraction obtenue entre 22 et 40 p. cent de sulfate d'ammonium. La purification est faible, de l'ordre de 2 avec la solution préparée par cycles de congélation-décongélation. Elle est supérieure, de l'ordre de 5, avec l'extrait à l'éther.

La plupart des autres Auteurs ont choisi une concentration de 50 p. cent de sulfate d'ammonium pour le traitement de l'antigène (NORCROSS et COGGINS, 1971 ; HENSON et coll., 1971 ; MORGAN, 1973 ; UEDA et coll., 1973 ; HART et BROUSSARD, 1973). Cette concentration nous parait élevée si l'on veut éliminer le plus possible le précipitogène C.

La chromatographie sur DEAE cellulose, dans les conditions que nous avons définies, apporte une purification modérée (facteur 3 à 5) pour un rendement parfois faible (25 à 75 p. cent).

.../..

La gelfiltration sur ACA_{54} poursuit cette purification en l'augmentant d'un facteur 2 en moyenne, avec un rendement voisin de 50 p. cent.

Ainsi, même dans les meilleures conditions, la pureté obtenue après traitement de l'extrait splénique par cette séquence de techniques demeure voisine, voire, nettement inférieure à celle de la préparation initiale d'origine cellulaire.

L'étude des précipitogènes ou des autres antigènes du virus AIE devra donc dorénavant être réalisée à partir de produits obtenus en culture cellulaire. Par ailleurs, il est difficile de comparer nos résultats de purification du précipitogène G avec ceux d'autres Auteurs, en l'absence de renseignement de cet ordre dans la littérature. Pour l'avenir, il nous parait indispensable que soit défini et adopté un sérum étalon anti G et une technique standard de titrage de l'antigène G. Seules ces mesures permettront de comparer correctement les résultats obtenus entre divers laboratoire, tant sur le plan du titrage des anticorps (et par suite du diagnostic) que sur celui de l'antigène.*

3) Propriétés

Comme d'autres Auteurs (NAKAJIMA et coll., 1972 ; UEDA et coll., 1973 ; MALMQUIST et coll., 1973) nous avons constaté que la spécificité antigénique du précipitogène G produit *in vivo* ou en culture cellulaire est identique.

De même, nous n'avons noté aucune communauté antigénique avec d'autres systèmes précipitants, d'origine virale ou non.

Nos résultats du comportement à la chaleur du précipitogène G sont semblables à ceux de NORCROSS et COGGINS (1971), UEDA et coll. (1973) et KANASHIRO (1974).

L'étude du comportement du précipitogène G vis-à-vis du pH pendant 15 mn nous a montré sa stabilité entre les pH de 4,5 et 10. A pH 2, l'activité du précipitogène n'est que partiellement retrouvée alors que KANASHIRO (1974) a constaté une résistance de l'antigène à ce pH pendant 4 heures.

A l'instar de la technique d'immunodiffusion radiale, l'électrophorèse en gélose contenant des anticorps anti G pourrait être utilisée pour le

.../..

* Nous avons commencé à oeuvrer dans ce sens en envoyant à 16 laboratoires utilisant les antigènes AIE, le sérum positif de référence Alfort en vue de comparer les résultats obtenus, les harmoniser, définir un seuil de positivité et prévoir un élément commun de référence.

titrage de l'antigène G. Cependant, celle-ci n'offre pas d'avantage particulier par rapport à la précédente.

Jusqu'à présent aucune photographie d'immunoélectrophorèse de l'antigène G n'a été présentée. Seuls UEDA et coll. (1973) ont signalé avoir étudié en immunoélectrophorèse le précipitogène G d'origine splénique ou cellulaire. Ces Auteurs ont constaté que le précipitogène G d'origine splénique se déplace plus rapidement vers l'anode, lors d'électrophorèse en agarose à pH 8,6, que le précipitogène d'origine cellulaire.

Lors d'immunoélectrophorèse à pH 8,6, en agar, nous avons retrouvé le précipitogène vers la cathode par rapport au puits de dépôt, en raison du courant d'électroendosmose. Le précipitogène G, à ce pH, est un peu plus chargé négativement que les gamma globulines. Nous n'avons pas constaté de différence significative de comportement entre les précipitogènes G d'origine splénique ou cellulaire.

Enfin, il reste à évoquer les résultats portant sur le poids moléculaire, la densité, le coefficient de sédimentation et le pH isoélectrique du précipitogène G. Pour ces quatre constantes, seuls les résultats de NORCROSS et COGGINS (1971) ont été publiés. Le tableau XXIX rassemble de façon comparée les résultats de ces Auteurs et les nôtres.

TABLEAU XXIX : Comparaison des résultats obtenus par NORCROSS et COGGINS (1971) et par TOMA et coll. (1975) pour le précipitogène G.

	COGGINS et NORCROSS	TOMA et coll.
Poids moléculaire	27.500	27.500 ± 20 p. cent
Densité apparente en chlorure de césium	1,18	1,29 ± 2 p. cent
Coefficient de sédimentation	2,1 S	2,4 S ± 5 p. cent
pH isoélectrique	5,8	6 ± 0,2

On constate sur ce tableau que les résultats des deux équipes concordent pour le poids moléculaire (déterminé par ultracentrifugation, NORCROSS et COGGINS ou par gelfiltration sur ACA_{54}, TOMA et coll.) et pour le pH isoélectrique du précipitogène G. En revanche, ils divergent pour le coefficient de sédimentation et surtout pour la densité.

La valeur de 2,4 S du coefficient de sédimentation semble plus

.../..

vraisemblable pour une espèce moléculaire d'un poids de 27.500. La valeur relativement faible de la densité apparente que nous avons trouvée, pourrait résulter d'une dénaturation partielle ou de la nature hétéroprotéique de l'antigène. Le nombre trouvé par NORCROSS et COGGINS est encore plus faible.

Les résultats de NORCROSS et COGGINS ont été obtenus à partir de précipitogène G d'origine splénique. Les nôtres portent à la fois sur des antigènes d'origine splénique et d'origine cellulaire qui ont fourni les mêmes réponses.

B/ Le précipitogène C

Nous avons mis en évidence cet antigène pour la première fois en 1972 à Alfort. Il a été produit à partir de divers organes d'équidés et de cellules E.D. chroniquement infectées par le virus AIE.

1) Production

a) Organes d'équidés infectés

Sur les 25 équidés utilisés, 24 ont fourni une rate contenant le précipitogène C. Celui-ci s'y trouve parfois seulement à l'état de traces. D'une manière générale, il est en quantité inférieure à celle du précipitogène G. Cependant, dans une rate, le précipitogène C prédominait et, dans une autre, on l'y trouvait en l'absence du précipitogène G, en même temps que des précipitines anti G.

Comme le précipitogène G, le précipitogène C peut apparaitre aussi précocement qu'au 5ème jour après l'inoculation et être retrouvé jusqu'au 27ème jour.

La présence du précipitogène C a également été constatée dans des solutions antigéniques utilisées pour le diagnostic et envoyées à Alfort par plusieurs chercheurs étrangers qui ne l'y avaient pas décelé. Jusqu'en 1975, aucune autre équipe de chercheurs travaillant sur l'AIE n'avait reconnu l'existence de ce second précipitogène. Tout au plus, certains Auteurs (HENSON et coll., 1971 ; PEARSON et coll., 1971 ; NAKAJIMA et coll., 1973) avaient signalé l'existence occasionnelle d'une double ligne de précipité en gélose. Dans une publication parue en 1973, MONTEVERDE a présenté des clichés montrant deux lignes de précipité désignées par la terminologie d'Alfort ; cependant, à aucun endroit de la publication il n'est fait mention des circonstances d'étude de l'antigène C, et par ailleurs, les aspects des lignes de précipité de certains clichés conduisent à émettre des réserves.

.../..

Les échantillons de précipitogène C et de sérum anti C produits à Alfort, ont été adressés à différentes équipes (NAKAJIMA, Japon ; PETROVIC, Yougoslavie ; BOULANGER ; Canada ; COGGINS, U.S.A.). Une communication personnelle de COGGINS en 1975, nous indiquait qu'il était en mesure de confirmer nos premiers résultats. Un autre de MALMQUIST, également en 1975, évoquait la mise en évidence d'un second précipitogène dans les cultures de cellules E.D. infectées par le virus AIE. D'après MALMQUIST, il s'agirait d'un antigène présent dans les cellules infectées, mais indépendant du virion, et qu'il dénomme "antigène associé aux cellules". L'étude comparée de l'antigène C et de l'antigène décrit par MALMQUIST va être effectuée, mais il semble très probable qu'il s'agisse de la même molécule.

Le retard dans la reconnaissance du précipitogène C tient, d'une part, et surtout, à la faiblesse de sa concentration dans les préparations d'origine splénique ou cellulaire, à sa fragilité, et, d'autre part, au fait qu'il est éliminé par les Auteurs qui utilisent la précipitation à 50 p. cent de sulfate d'ammonium comme moyen de purification de l'antigène AIE destiné au diagnostic par immunodiffusion en gélose.

Le précipitogène C est produit par les équidés infectés par la souche Wyoming sauvage ou adaptée aux cultures cellulaires et par d'autres souches de virus AIE comme en témoigne sa présence dans la rate des équidés que nous avons infectés par ces souches, ou celle des précipitines correspondantes dans le sérum.

A l'instar du précipitogène G, le précipitogène C est retrouvé dans d'autres organes que la rate, en particulier, souvent dans le poumon (14 fois sur 18) mais aussi dans le rein, le foie, le thymus et les ganglions lymphatiques.

La mise au point de la technique d'immunodiffusion radiale avec un sérum spécifique anti C nous a permis de mesurer la quantité d'antigène C des extraits spléniques des équidés sacrifiés et d'apprécier les étapes de sa purification. Comme pour le précipitogène G, l'aptitude d'un équidé à produire du précipitogène C demeure soumise à des facteurs mal contrôlés.

Ainsi, la production du précipitogène C *in vivo* connait un faible rendement et se montre plus délicate que celle du précipitogène G.

b) Culture cellulaire

La reconnaissance de la présence du précipitogène C dans les solutions antigéniques préparées à partir de cultures cellulaires infectées par le virus AIE a été plus tardive. Ceci découle, tout d'abord, du fait que

.../..

nous n'avons disposé d'un système cellulaire pratique pour la production d'antigène AIE (MALMQUIST et coll., 1973) que plusieurs années après la mise au point de la technique de production *in vivo* (COGGINS et NORCROSS, 1970).

Les essais que nous avions réalisés antérieurement pour la culture du virus AIE sur leucocytes de cheval, nous ont montré que cette technique était trop délicate pour un usage de routine de production d'antigène.

Par ailleurs, les premiers essais de mise en évidence du précipitogène C sur des extraits d'origine cellulaire (un antigène préparé à partir de culture de leucocytes par NAKAJIMA, un autre à partir de cellules E.D. par PEARSON) se sont soldés par un échec ou par des résultats non démonstratifs (TOMA et GORET, 1973). A tel point, que nous nous sommes demandé si la souche Wyoming adaptée à la culture cellulaire ne se distinguait pas de la souche sauvage par une carence en production de précipitogène C. Pour le vérifier, nous avons infecté un poney (Eden) à l'aide de cette souche. Ce dernier a répondu en produisant des précipitines anti C, qui sont apparues 30 jours après les précipitines anti G.

Parallèlement à ces résultats, nous avons apporté la démonstration de la présence du précipitogène C dans un nouvel échantillon d'antigène préparé à partir de cultures de leucocytes et envoyé par NAKAJIMA, ainsi que sur des lots d'antigène préparés à Alfort à partir des cellules E.D.

Par conséquent, en culture cellulaire comme *in vivo*, la production du précipitogène C se révèle plus délicate que celle du précipitogène G.

2) Isolement, purification et propriétés

Le précipitogène C a été soumis à la même séquence de techniques d'isolement et de purification que le précipitogène G : précipitation au sulfate d'ammonium, chromatographie sur DEAE cellulose et gelfiltration sur ACA_{54}. Ces techniques ont permis d'obtenir un produit suffisamment pur pour être soumis à une étude de ses caractéristiques physico-chimiques.

Le précipitogène C se révèle, d'une manière générale, plus labile que le précipitogène G, en particulier sous l'action de la chaleur et des pH acides ou basiques.

Il est plus petit que le précipitogène G (poids moléculaire d'environ 20.000, celui de G étant de 27.500 ; constante de sédimentation de 1,7 S contre 2,4 S), et son pH isoélectrique est nettement différent (voisin de 9 au lieu de 6).

En immunoélectrophorèse en agar, en tampon borate pH 8,6, il migre davantage vers l'anode que le précipitogène G.

.../..

Nous avons pu apporter la preuve de l'absence de communauté antigénique entre le précipitogène G et le précipitogène C, ainsi que, par ailleurs, celle de l'identité de la spécificité antigénique du précipitogène C produit *in vivo* ou en culture cellulaire. Les zones de synthèse du précipitogène C dans les cellules infectées par le virus AIE semblent être les mêmes que celles de production du précipitogène G d'après les résultats de l'immunofluorescence indirecte employant un sérum anti G et un sérum anti C.

Le précipitogène C est spécifique d'espèce virale AIE et commun aux différentes souches, à l'instar du précipitogène G. Il ne joue pas de rôle dans l'immunité anti AIE comme l'a démontré l'entière sensibilité d'un poney hyperimmunisé avec lui et possédant un titre sérique élevé de précipitines anti C.

Il reste à attendre que ces résultats soient confirmés, précisés ou modifiés par d'autres Auteurs. Nous sommes conscient du caractère arbitraire de l'appellation que nous avons donnée aux précipitogènes G et C. Elle sera peut être changée, dans un souci d'harmonisation, en prévision de l'isolement d'autres protéines du virus de l'AIE et remplacée par la nomenclature proposée par AUGUST et coll. (1974) pour les protéines virales des virus oncogènes à RNA. Ainsi, l'antigène G devriendrait "p27" et l'antigène C, "p20" en fonction de leur poids moléculaire.

II - LES PRECIPITINES ANTI AIE

A/ Etude cinétique des précipitines

L'infection expérimentale de différents équidés par le virus AIE a permis de préciser les modalités d'apparition des précipitines anti G et anti C, en fonction de la souche virale et de la dose d'inoculum. Elle a servi également à l'étude des fluctuations ultérieures des titres des précipitines, en comparaison avec ce que l'on observe chez les animaux naturellement infectés ou soumis à des injections de précipitogènes G et C. Enfin, elle a rendu possible l'étude comparée de l'évolution des précipitines, des anticorps révélables par immunofluorescence, des sidéroleucocytes et de la composition des protéines sériques, chez les animaux atteints d'AIE.

1) Apparition des précipitines

a) Précipitines anti G

Les dates limites d'apparition des précipitines anti G ont été de 11 et

.../..

de 57 jours après l'infection expérimentale par une souche de virus AIE. Ces dates sont un peu plus étalées que celles rapportées par d'autres Auteurs :

15 à 31 jours après l'inoculation (HENSON et coll., 1973)

11 à 25 jours après l'inoculation (MORGAN, 1973)

14 à 40 jours après l'inoculation (COGGINS, 1974)

Elles sont conditionnées par la nature des souches virales employées (souche Wyoming, souches françaises) et par la quantité de sérum injecté (0,01 ml à 200 ml).

La figure 37 montre bien le rôle de la souche virale dans le délai d'apparition des précipitines anti G : tous les équidés infectés par la souche Wyoming d'origine animale ont produit des précipitines anti G entre le 11ème jour et le 18ème jour après l'infection. Au contraire, les équidés infectés par des souches françaises (souche Alfort Arlette, Avril, Retz), moins virulentes en général, n'ont élaboré des précipitines anti G qu'entre le 19ème jour et le 57ème jour.

Parmi les équidés infectés par la souche Wyoming, le délai d'apparition des précipitines anti G est d'autant plus court que la dose de sérum virulent inoculé est élevée :

11 à 14 jours pour 150 à 200 ml de sérum

15 jours pour 0,5 ml de sérum

18 jours pour 0,1 ml de sérum

La figure 37 montre également le rapport existant entre la fièvre et l'apparition des précipitines anti G. Sur cette figure, la fièvre apparue après la production des précipitines anti C n'a pas été représentée.

Les différents équidés ayant synthétisé des précipitines anti G avant le 20ème jour suivant l'inoculation ont tous présenté une fièvre bien marquée. En revanche, les équidés qui n'ont produit des précipitines anti G qu'après le 25ème jour n'ont eu qu'une réaction fébrile modérée ou presque nulle.

Les précipitines anti G ont été décelées, au plus tard, 6 jours après le début de la fièvre. Pour NAKAJIMA et USHIMI (1972), elles commencent à être détectées 2 à 10 jours après le premier pic thermique. Fréquemment, chez les équidés infectés avec des souches françaises, et plus rarement chez les équidés infectés par la souche Wyoming (ex : Sassy), les précipitines anti G sont apparues avant une réaction fébrile. La fièvre peut ne survenir que plus de 30 jours après les précipitines anti G (ex : Eden). Les précipitines anti G peuvent même apparaître et augmenter en l'absence de toute hyperthermie (ex : Siamato).

.../..

Dans la plupart des cas, les sidéroleucocytes n'apparaissent dans le sang veineux que dans les jours suivant la première crise. Aussi, le plus souvent, ils ne sont décelables qu'après l'apparition des précipitines anti G (Eden, Noiraud, Sassy, Tétu, Vril...). Parfois, ils les précèdent, lorsque la fièvre est très précoce (Tinamite) ou même en l'absence d'une réaction fébrile nette (Siamato).

Après injection du précipitogène G à des équidés, les précipitines correspondantes sont décelables dans un délai comparable à celui rencontré chez les animaux infectés par la souche de virus virulent Wyoming. Dans nos expériences, il a été de 14 jours.

Chez les poulains nés de mère infectée par le virus AIE, les précipitines anti G apparaissent dans le sérum dans les heures suivant l'absorption du colostrum.

b) Précipitines anti C

L'existence et la spécificité des précipitines anti C ont été démontrées à Alfort dès 1972 (TOMA et coll., 1973). Jusqu'à ce jour, aucune publication d'un autre laboratoire n'en a fait mention, en raison des difficultés de mise en évidence du précipitogène correspondant.

Chez les équidés infectés expérimentalement par le virus AIE, les précipitines anti C n'apparaissent jamais avant les précipitines anti G. Dans nos expériences, elles n'ont pu être décelées qu'une seule fois aussi tôt que les précipitines anti G (Siamato). En général, elles ne sont constatées que quelques jours à quelques semaines après les précipitines anti G.

Le délai séparant l'apparition des précipitines contre ces deux antigènes varie avec la souche employée. Avec les souches françaises (Alfort Avril, Retz, Arlette), il est nettement plus long qu'avec la souche Wyoming prélevée sur l'animal (figure 37).

Chez les équidés infectés par cette dernière, il a varié de 3 (Tétu) à 13 jours (Bienvenue). Pour les équidés infectés par des souches françaises, les chiffres extrêmes sont très éloignés (0 jour pour Siamato, 215 jours pour Leticia) mais en général, il a été de 19 (Vril) à 52 jours (Tinamite). Enfin, pour l'équidé infecté avec la souche Wyoming adaptée à la culture cellulaire E.D., il a atteint 30 jours.

Chez les équidés infectés par la souche Wyoming d'origine animale, les précipitines anti C sont toujours apparues après la fièvre. Chez un équidé infecté dans les conditions naturelles par le virus de l'AIE, le fait de

.../..

ne pas déceler de précipitines anti C indique qu'il s'agit très vraisemblablement d'une infection récente.

Le comportement d'une souche française a été plus spécialement étudié. La jument Arlette, infectée par le virus AIE dans les conditions naturelles, a vu son faible taux de précipitines anti C s'annuler au cours de sa maladie. La souche Arlette, injectée à très faible dose (0,01 ml) au poney Leticia, n'a entrainé aucune synthèse d'anticorps anti C, en l'absence de réaction clinique ou thermique. Pour vérifier si cette absence était liée à la faiblesse de l'inoculum (et par suite de la maladie engendrée) ou constituait un caractère propre à la souche Arlette, cette dernière a de nouveau été inoculée à un poney (Tinamite), mais à dose plus importante (50 ml). Le poney Tinamite a présenté une AIE aiguë, se traduisant par plusieurs crises, et a produit des précipitines anti C après un long délai (52 jours).

Du sérum de Léticia a alors été injecté à un âne et ce dernier a réagi par la production des précipitines anti C en même temps que les précipitines anti G, en l'absence de toute hyperthermie.

Par suite, pour cette souche, on ne peut pas lier la rapidité d'apparition des précipitines anti C à l'intensité de la maladie et il faut reconnaitre que les différences individuelles de réponse à l'inoculation peuvent être très grandes.

Après injection du précipitogène C à des équidés, les précipitines correspondantes apparaissent dans des délais comparables à ceux observés pour les animaux infectés par la souche Wyoming (21 J.).

2) Evolution des précipitines

a) Précipitines anti G

- Chez les animaux adultes infectés dans des conditions naturelles ou expérimentales, après leur apparition, les précipitines anti G demeurent présentes de manière permanente et, ce, pendant des temps très longs (8 ans pour la plus longue période étudiée). Nous n'avons jamais constaté la disparition, même momentanée, des précipitines anti G chez les divers chevaux étudiés. Ceci est en accord complet avec les constatations de COGGINS et en opposition avec des cas occasionnellement signalés, de disparition des précipitines.

Le taux des précipitines anti G varie selon les équidés et en fonction du temps.

Chez certains équidés, le titre des précipitines anti G reste faible, que la maladie soit intense (ex : Arlette) ou au contraire, bénigne

.../..

(ex : Siamato). Chez d'autres, il atteint des valeurs très élevées. Dans notre système de lecture, le titre maximal observé a été de 1/4096 (Géronimo).

D'une manière générale, le taux des précipitines anti G a tendance à diminuer au moment de l'accès et à augmenter dans les jours ou les semaines suivants. Plusieurs exemples illustrent clairement cette notion : Tinamite, jour 320 (figure 33), Leticia, jour 208 (figure 32), Retz, jours 18 et 28 (figure 39).

Il n'est pas possible d'établir un lien constant entre le titre des précipitines anti G chez un équidé et l'ancienneté de son infection par le virus AIE. Ainsi, le titre maximal chez le poney Géronimo est atteint après la première crise (et l'hyperimmunisation) et le taux des précipitines a ensuite diminué lentement, malgré le déroulement de 7 autres crises en l'espace de quelques mois, alors que l'évolution inverse est souvent rencontrée.

Ces constatations sont en accord avec celles de NAKAJIMA et coll. (1974).

On ne peut pas davantage établir de relation exacte entre le titre des précipitines anti G et le nombre de sidéroleucocytes dans le sang circulant.

En général, le nombre maximal de sidéroleucocytes est atteint dans les jours suivant une crise, et l'évolution de leur taux est un bon indice du degré de l'anémie et de la gravité de la maladie (cf la plupart des courbes). Néanmoins, on peut parfois constater un nombre élevé de sidéroleucocytes en l'absence de réaction clinique ou thermique (ex : Retz au jour 145, figure 39) et, à l'inverse, l'absence ou un très petit nombre seulement de sidéroleucocytes chez des équidés atteints d'une AIE aiguë : il en est ainsi pour Dresdemone dont le nombre d'hématies par mm3 est passé en quelques semaines de 8 millions à 4 millions (figure 30) sans que les sidéroleucocytes ne dépassent 11 pour 100.000 leucocytes.

- Chez les poulains nés de mère infectée par le virus AIE et eux-mêmes non infectés, le titres des précipitines anti G diminue lentement au cours du temps. Les anticorps disparaissent après un délai qui est fonction du titre du colostrum en précipitines. Il varie de quelques semaines à plusieurs mois (6 mois pour Rock).

b) Précipitines anti C

- Chez les animaux adultes, le taux des précipitines anti C subit, lui aussi,

.../..

des fluctuations après l'apparition de ces anticorps. D'une façon générale, ce taux reste inférieur à celui des précipitines anti G. Rares sont les chevaux qui, dans les conditions naturelles, possèdent un taux de précipitines anti C supérieur à celui des précipitines anti G. Dans ce cas, on peut penser qu'il s'agit de comportement particulier de l'animal infecté plutôt que d'une propriété liée à la souche virale. Néanmoins, nous n'avons pas vu vérifier cette hypothèse, en l'absence de reproduction possible de l'infection à partir d'un sérum de cheval naturellement infecté et de titre anti C supérieur au titre anti G.

Les variations du taux des précipitines anti C ne sont pas strictement superposables à celles des précipitines anti G. Cependant, comme pour les précipitines anti G, le taux des précipitines anti C diminue souvent au cours de la crise, pour augmenter ultérieurement.

Tous les équidés infectés, sauf un (Leticia) ont synthétisé des précipitines anti C. De même, nous avons constaté des précipitines anti C sur tous les chevaux infectés dans les conditions naturelles depuis suffisamment de temps. Chez un seul animal (Arlette), nous avons observé une disparition des précipitines anti C pendant plusieurs mois avant la mort, au cours de l'évolution d'une forme chronique intense d'AIE avec en permanence un taux très élevé de gamma globulines (plus de 50 p. cent) et de sidéroleucocytes (plus de 1.500 pendant la période évoquée). On peut supposer que chez cette jument, les précipitines anti C, antérieurement déjà en faible quantité, étaient combinées avec de l'antigène sans doute produit en permanence en quantité importante au cours des mois précédant la mort.

Le retard presque constant d'apparition des précipitines anti C par rapport aux précipitines anti G, ainsi que l'infériorité tout aussi constante des titres constatés peuvent être rapportés à la différence de poids moléculaire des deux précipitogènes ; le plus petit (C) possèderait un pouvoir antigénique plus faible. Il peut s'agir, également, d'une différence du nombre de molécules de G et C présentes dans le virion.

- Chez les poulains sains issus de mère infectée par le virus AIE, les précipitines anti C diminuent au cours des semaines suivant la naissance et disparaissent avant les précipitines anti G. Le fait de ne trouver, chez un poulain né de mère infectée, que des précipitines anti G est en faveur d'une simple élimination d'anticorps colostraux et de l'absence d'infection du poulain par le virus.

.../..

3) Relations avec la cinétique des anticorps révélés par immunofluorescence indirecte

Jusqu'à présent, l'immunofluorescence directe ou indirecte n'a été appliquée à l'AIE que pour des frottis d'organes (Mc GUIRE et coll., 1971) ou des cultures de cellules de première explantation (leucocytes : USHIMI et coll., 1970 ; CRAWFORD et coll., 1971 ; cellules rénales : KONO et YOSHINO, 1974).

La lignée cellulaire E.D. chroniquement infectée que nous avons employée fournit un excellent moyen d'étude des antigènes AIE ou des anticorps correspondants, grâce à la facilité et à la perennité de production de tapis de cellules infectées.

Elle autorise la préparation en quantité importante de lamelles qui peuvent ensuite être conservées au congélateur, en vue d'une utilisation ultérieure. Cependant, elle ne permet pas d'effectuer de séroneutralisation décelable par immunofluorescence puisque les cellules sont déjà infectées et que l'introduction d'un sérum neutralisant homologue dans le milieu de culture n'entrave pas la multiplication virale.

- Les aspects obtenus au cours de l'étude par l'immunofluorescence indirecte sont très proches de ceux publiés par d'autres Auteurs. Cependant, nous n'avons pas observé la localisation préférentielle le long de la membrane cytoplasmique décrite par CRAWFORD et coll. (1971). La fluorescence, exclusivement cytoplasmique, se présente, le plus souvent, le long de la membrane nucléaire, ou, dansle cytoplasme, de part et d'autre du noyau, sous forme de granules bien délimités et intensément colorés. Elle envahit parfois la presque totalité du cytoplasme.

Nous n'avons pas constaté de différence significative dans les aspects morphologiques lors de traitement des cellules E.D. par un sérum anti C, un sérum anti G, des sérums anti G et C provenant de chevaux infectés par une souche hétérologue, ou homologue, voire identique à celle infectant les cellules.

De même la saturation de sérums anti AIE par des antigènes provenant d'un stade antigéniquement différent d'une même souche supprime toute activité révélable en immunofluorescence indirecte. Ces deux faits sont en faveur de l'impossibilité de repérer, par la technique d'immunofluorescence indirecte, les anticorps neutralisants spécifiques de l'étape antigénique au cours de l'évolution du virus *in vivo*. L'immunofluorescence s'applique donc à des antigènes communs aux différentes souches, comme l'immunodiffusion en gélose, et non pas aux antigènes superficiels d'enveloppe,

.../..

spécifiques de souche virale ou de stade d'évolution d'une souche, exclusivement définis par la séroneutralisation.

- Les dates d'apparition des anticorps décelables par immunofluorescence chez les équidés infectés par une souche de virus AIE sont très proches de celles de l'apparition des précipitines. Dans nos expériences, menées sur les équidés ayant répondu le plus tardivement en immunodiffusion en gélose, le délai le plus court a été de 35 jours, le plus long de 57. Par suite, et en raison des inconvénients liés à l'incommodité de réalisation de la technique, aux difficultés éventuelles de lecture de la réaction, l'immunofluorescence ne peut pas être employée comme technique de routine pour soumettre au dépistage ou au diagnostic de l'AIE un grand nombre de sérums. Son emploi ne peut se concevoir que de manière occasionnelle, lorsqu'une réponse urgente est souhaitée, puisqu'il est possible de fournir un résultat positif trois heures après l'arrivée du sérum au laboratoire, à l'instar de ce que donnerait la technique d'électrosynérèse appliquée à l'AIE.

- Les anticorps révélés par immunofluorescence indirecte appartiennent vraisemblablement aux mêmes classes que les précipitines anti AIE (IgG et IgT) car on constate une distribution semblable de l'activité révélée par ces deux techniques, dans les fractions des sérums passés sur DEAE cellulose. Ainsi, chez Retz et Solitaire, les anticorps révélés par immunofluorescence sont surtout présents dans les pics 1 et 1bis, commes les précipitines. Pour le sérum de Géronimo 4, au contraire, c'est la fraction 3 qui est la plus active.

  On retrouve ce parallélisme avec les IgM et les IgA du colostrum, car pour la fraction qui contient ces immunoglobulines, on constate en immunofluorescence une activité aussi faible que celle notée en immunodiffusion.

  Ainsi, les antigènes AIE et les anticorps correspondants intervenant dans l'immunodiffusion sont vraisemblablement les mêmes que ceux révélés par l'immunofluorescence indirecte.

4) Relation avec l'évolution des modifications du protéinogramme sérique

Avant la mise au point du test d'immunodiffusion en gélose pour le diagnostic de l'AIE, différents Auteurs ont étudié les modifications du protéinogramme des chevaux atteints d'AIE et ont tenté d'en tirer des conclusions

.../..

applicables au diagnostic de la maladie. A tel point, que l'augmentation du taux de gamma globulines chez des chevaux cliniquement suspects d'AIE suffit, dans certains pays, pour porter un diagnostic et entrainer des mesures officielles (au Brésil, abattage des chevaux cliniquement suspects et possédant un pourcentage de gamma globulines supérieur à 24, REIS, 1974).

La possibilité de disposer dorénavant du test pratique et spécifique de l'immunodiffusion en gélose, pour déceler l'infection par le virus AIE, efface l'intérêt de l'étude du protéinogramme des équidés, pour le diagnostic de cette maladie. Il était néanmoins intéressant de suivre en parallèle, dans le temps, l'évolution de la réponse en précipitines et les modifications du protéinogramme des chevaux infectés.

Cette étude nous a confirmé tout d'abord l'importance des variations rencontrées dans le tracé et la proportion des diverses fractions du protéinogramme d'équidés sains, signalées par CHARY et DUFOUR (1965). Nous avons obtenu, en effet, des courbes correspondant aux différentes catégories décrites : selon les cas, prédominance des globulines alpha ou bêta, présence d'un pic unique ou de deux pour chaque catégorie de globulines etc.

Le pourcentage des gamma globulines peut varier du simple au double chez des équidés apparemment sains et non producteurs de sérum. Plusieurs équidés étudiés possédaient, avant inoculation, et de manière permanente, un taux de gamma globulines supérieur à 24, pouvant atteindre ou dépasser 30. Ceci corrobore les résultats de REIS (1974) qui a trouvé que près de la moitié de 23 chevaux indemnes d'AIE possédaient plus de 24 p. cent de gamma globulines sériques.

Dans la plupart des cas, au cours de l'infection d'un équidé par le virus AIE, nous avons constaté, comme modification essentielle du protéinogramme, une augmentation progressive du pourcentage des gamma globulines, entrainant une diminution du rapport alb/glob. Cette notion est classique (cf première partie).

Nous avons pu montrer que l'augmentation des gamma globulines est souvent précoce, contemporaine de la fièvre, de l'apparition des sidéroleucocytes et de celle des précipitines anti G. Elle précède celle des précipitines anti C.

Ces résultats diffèrent de ceux de LARS RYDEN (1975) qui, à l'aide d'une technique d'électrophorèse bidimensionnelle, n'a constaté aucun changement dans les protéines sériques de chevaux atteints cliniquement d'AIE depuis peu de temps.

De manière régulière, cette augmentation porte initialement sur les gamma globulines les plus rapides, dans la zone correspondant aux globulines T

.../..

(DREGUSS et LOMBARD, 1954 ; DITCHFIELD, 1967). Au cours des jours ou des semaines suivantes, le tracé des gamma globulines, se modifie, redevient symétrique ou connait une augmentation des globulines les plus lentes. Nous avons constaté cette évolution après la première crise d'AIE de chevaux récemment infectés ou à la suite d'une crise ultérieure survenant chez des équidés infectés depuis longtemps.

Le taux des gamma globulines n'est pas un reflet exact du titre des précipitines anti AIE. Chez des chevaux atteints de la forme chronique, on peut même constater une opposition paradoxale entre un très haut pourcentage de gamma globulines et un faible titre de précipitines.

Chez les équidés infectés par le virus AIE et redevenus apparemment sains, le pourcentage des gamma globulines diminue et se stabilise aux environs du chiffre précédant l'infection.

Par ailleurs, chez certains équidés, le tracé du protéinogramme ne se modifie guère après l'infection par le virus AIE et, ce, malgré l'évolution d'une forme aiguê conduisant à la mort.

REIS (1974) a constaté, de même, que 29 p. cent de 32 chevaux infectés par le virus AIE possédaient un taux de gamma globulines inférieur à 24 p. cent.

Chez les équidés infectés par le virus AIE on constate donc, en général, des modifications assez précoces du protéinogramme se traduisant par une augmentation des gamma globulines d'abord rapides puis lentes, modifications répétées au cours de l'évolution de la maladie mais ni constantes ni spécifiques.

B/ Nature des précipitines

NAKAJIMA et coll. (1971) ont montré que l'activité précipitante du sérum de chevaux infectés par le virus AIE est située dans la fraction gamma globulinique, de constante de sédimentation 7 S. Nos résultats viennent confirmer et développer ceux de NAKAJIMA et coll.

Par ailleurs, Mc GUIRE et coll. (1971) ont démontré le rôle de la classe d'immunoglobulines dans la fixation du complément par le sérum de chevaux infectés par le virus AIE. Quelques semaines après l'infection, les IgT, incapables d'assurer la fixation du complément, deviennent prépondérantes par rapport aux IgG dont elles inhibent l'action *in vitro*. Nous n'avons pas obtenu dans tous les cas, le même type de résultat avec les précipitines, car l'activité précipitante est souvent retrouvée surtout dans les IgG, même longtemps après l'infection.

.../..

1) Précipitines anti G

- La nature de la classe des immunoglobulines sériques contenant des précipitines anti G a été étudiée chez 5 équidés (trois poneys et deux chevaux). Chez trois d'entre eux, un seul échantillon de sérum a été employé, prélevé à une date variable après l'infection :

8 mois et demi pour le poney Tétu

22 mois pour le cheval Retz

7 ans et 6 mois pour la jument Solitaire

Chez chacun de ces 3 équidés, la majorité de l'activité précipitante anti G a été trouvée dans la fraction riche en IgG. On ne constate pas de parallélisme entre l'ancienneté de l'infection et la richesse du sérum en précipitines de la classe des IgT puisque le sérum du poney Tétu, infecté depuis moins d'un an, contient plus de précipitines IgT (45 p. cent) que celui de Retz infecté depuis près de deux ans (15 p. cent) et celui de Solitaire infectée depuis plus de 7 ans (20 p. cent).

La richesse en IgT semble être davantage en rapport avec l'intensité de l'atteinte clinique de l'équidé qu'avec l'ancienneté de l'infection. Le sérum de Tétu a en effet été prélevé 45 jours après une crise d'AIE alors que la dernière crise de Retz remontait à 7 mois avant le prélèvement et que la jument Solitaire n'a jamais été cliniquement atteinte. Cette hypothèse a été vérifiée en étudiant l'évolution de la nature de la classe des précipitines anti G chez deux poneys ayant présenté plusieurs crises, le poney Eden et le poney Géronimo. Chez ce dernier, après l'infection, le pourcentage de participation des IgT à l'activité précipitante anti G passe de 8 après la première crise, à 50 après la 7ème crise et à 66 après la 10ème crise. Un dernier prélèvement (Géronimo 5) effectué 262 jours après la dernière crise et alors que le poney avait retrouvé un état normal depuis plusieurs mois, montre une tendance à la diminution du rôle de la fraction contenant les IgT au sein des précipitines anti G (56 p. cent).

Au cours de chaque crise d'AIE on assiste à une multiplication virale importante et, par suite, à une nouvelle sollicitation du système immunitaire de l'organisme. En quelques sorte, chaque crise peut être comparée à une injection de rappel. C'est dans ce sens que l'on peut comparer la réponse en précipitines des équidés infectés par le virus AIE à celle des chevaux producteurs de sérum anti toxines protéiques. On trouve, dans un cas comme dans l'autre, une augmentation progressive des précipitines de la classe des IgT au cours de l'hyperimmunisation (chevaux producteurs de sérum) ou de l'évolution d'une série de crises (chevaux infectés par le virus AIE).

.../..

Cependant, dans l'AIE, ce phénomène ne semble pas être régulier puisque les résultats de l'étude d'un échantillon "précoce" et d'un échantillon "tardif" du poney Eden montrent, au contraire, une augmentation du rôle des IgG dans l'activité précipitante anti G des sérums, après l'évolution de plusieurs crises.

- Dans le colostrum de jument infectée d'AIE, on trouve également l'essentiel de l'activité précipitante anti G dans les fractions contenant les IgG et les IgT. Le rôle des IgM et des IgA parait modeste mais demande à être précisé.

2) Précipitines anti C

L'étude de la classe des précipitines anti C a fourni des résultats comparables à ceux de l'étude des précipitines anti G, parfois simplement plus accusés.

Pour les équidés infectés depuis longtemps et en bonne santé apparente depuis plusieurs mois, la proportion de précipitines anti C correspondant à la fraction qui contient les IgT est faible (12 à 20 p. cent). En revanche, pour le poney Tétu, malade 45 jours avant le prélèvement de sang, la proportion des précipitines anti C de la fraction contenant les IgT atteint 83 p. cent (contre 45 pour les précipitines anti G).

De même, après l'infection du poney Géronimo par le virus AIE, le taux des précipitines anti C de la fraction correspondant aux IgT passe de 18 p. cent après la première crise à 66 p. cent après la 7ème crise et à 93 p. cent après la 10ème crise (contre 66 p. cent pour les précipitines anti G). 262 jours après la dernière crise, le pourcentage est retombé à 46.

Chez le poney Eden, on constate aussi une augmentation du rôle des précipitines présentes dans la fraction qui contient les IgT, à la suite de l'évolution de plusieurs crises (de 45 p. cent à 78 p. cent).

Les résultats de l'étude des précipitines anti C confirment donc ceux de l'étude des précipitines anti G. On observe, en général, un parallélisme dans la distribution de l'activité précipitante anti G et anti C dans les fractions des sérums (Retz, Solitaire, Géronimo). Plus rarement, on note une divergence (Tétu, Eden).

Il faut apporter à ces conclusions deux réserves : la première tient au fait que nous n'avons pris en considération que les deux principales classes d'immunoglobulines sériques, les IgG et les IgT, en négligeant les diverses autres classes et sous classes d'immunoglobulines sériques équines. La seconde tient au nombre limité de sérums et d'équidés étudiés. Il parait nécessaire de l'étendre à d'autres animaux infectés par le virus AIE, afin d'obtenir

.../..

une confirmation de ces notions, et d'étudier l'activité précipitante anti AIE d'autres classes d'immunoglobulines chez les équidés infectés.

III - L'IMMUNITE ANTI AIE

De nombreux Auteurs ont déjà étudié l'immunité anti AIE (cf première partie). Leur critère d'appréciation de la résistance des équidés était le comportement clinique associé à l'évolution de la température des animaux. Il demeure, bien sûr, le critère majeur mais parfois insuffisamment sensible et, surtout, il n'autorise pas la distinction entre réponse à la nouvelle épreuve et maladie liée à l'infection initiale. Par ailleurs, dans de nombreuses publications, des précisions sur les caractéristiques exactes des virus employés manquent.

Au cours de ces dernières années, KONO et coll. ont amélioré l'étude de la résistance à l'épreuve par le virus AIE en ajoutant à l'appréciation de la réaction clinique, la recherche de la virémie et celle de la production d'anticorps neutralisant la souche d'épreuve.

Ces techniques permettent de préciser la nature de la souche en cause dans les troubles observés et on conduit ces Auteurs à constater l'évolution de crises d'AIE dûes au virus initial, après infection par une nouvelle souche. Cependant, elles demeurent d'emploi difficile dans le cas de l'AIE. Par ailleurs, KONO et coll. ne signalent pas, en général, le stade antigénique exact de leurs souches d'épreuve.

Parallèlement aux recherches de KONO et coll., nous avons étudié le comportement d'équidés infectés par le virus AIE ou hyperimmunisés avec les antigènes G et C, lors d'inoculation d'épreuve. A la surveillance clinique et thermométrique, nous avons joint le titrage des précipitines anti G et anti C ainsi que la numération des sidéroleucocytes. Ces techniques ne permettent pas d'établir avec certitude l'origine des réactions des équidés après l'épreuve. Lorsque la température d'un équidé est normale et les sidéroleucocytes absents depuis plusieurs mois et que l'on constate une crise d'AIE peu de temps après l'inoculation d'épreuve, le risque d'imputer à tort celle-là à celle-ci est minime. En revanche, dans d'autres cas, ce risque n'est pas négligeable et seule l'étude des caractères antigéniques par séro-neutralisation du virus isolé pendant la crise, et celle des anticorps neutralisants apparaissant ultérieurement, permettraient de lever

.../..

le doute. Pour cette raison, l'analyse de certains de nos résultats doit tenir compte de ces réserves liminaires.

A/ Equidés hyperimmunisés avec le précipitogène G ou C

Des recherches antérieures avaient établi l'inefficacité de préparations contenant du virus AIE inactivé, pour protéger les équidés (cf première partie). Nos expériences conduites avec les précipitogènes G et C confirment cette absence d'immunité chez des équidés possédant des taux de précipitines anti G ou anti C élevés.

De plus, la présence de ces anticorps semble même rendre plus grave l'évolution de la maladie après l'inoculation (poneys Gélose et Bianco) à l'instar de ce qui a déjà été signalé par d'autres Auteurs pour l'AIE (BALOZET, 1934 ; BALOZET, 1936 a ; MITCHELL et coll., 1944 ; DREGUSS et LOMBARD, 1954) et que l'on peut constater dans d'autres maladies, comme la maladie aléoutienne du vison par exemple (PORTER et coll., 1972). Cependant, le nombre d'équidés hyperimmunisés avec les précipitogènes G et C est trop faible pour autoriser une conclusion certaine quant au rôle des précipitines anti G et anti C dans une augmentation de la sensiblité à l'épreuve.

B/ Comportement d'équidés déjà infectés

1) Vis-à-vis d'une autre souche

- Les résultats obtenus conduitent à la confirmation de la sensibilité intégrale d'équidés déjà infectés, vis-à-vis de l'épreuve par une souche hétérologue de virus AIE, et ceci aussi bien pour des chevaux initialement infectés dans des conditions naturelles qu'expérimentales, quelques mois ou plusieurs années auparavant.

L'intensité de la réaction observée après l'inoculation d'épreuve est fonction de la virulence de la souche. Les équidés initialement infectés par une souche française puis éprouvés par la souche Wyoming ont présenté une maladie plus grave (et souvent mortelle) que les équidés initialement infectés par la souche Wyoming et éprouvés par une souche française.

- A l'inverse, certains équidés se sont montrés complètement résistants lors d'infection par une souche hétérologue de virus AIE, en particulier la souche Wyoming très virulente.

- L'origine de cette différence de comportement d'équidés infectés et soumis à une nouvelle inoculation est difficile à établir et à rapporter à un facteur précis et unique.

.../..

. Ainsi, deux équidés initialement infectés par la même souche (Retz et Retzquilleur) se sont comportés de manière diamétralement opposée lors d'une épreuve identique parla souche Wyoming : le poney Retzquilleur mourait au 31ème suivant l'inoculation, après avoir présenté une évolution d'AIE aiguë, alors que chez le cheval Retz on n'enregistrait aucune modification de la température ou des sidéroleucocytes. Certes, plusieurs paramètres diffèrent chez ces deux équidés (tableau XXX) mais les deux éléments essentiels (souches de virus) sont identiques.

TABLEAU XXX : Caractéristiques des deux équidés infectés par les mêmes souches.

	Retz	Retzquilleur
Espèce	cheval	poney
Infection	naturelle	expérimentale
Délai séparant les deux infections	330 jours environ	197 jours

. La relation entre l'ancienneté de l'infection et la résistance des équidés à l'inoculation d'une souche hétérologue, évoquée par KONO, n'est pas véritablement confirmée par nos expériences, comme le montre le tableau des résultats comparatifs obtenus au Japon et à Alfort.

TABLEAU XXXI : Comparaison des résultats obtenus au Japon et à Alfort lors d'inoculation par une souche hétérologue, d'équidés déjà infectés par le virus AIE. Les chiffres correspondent aux équidés utilisés.

Résistance à une nouvelle infection	Nombre de jours après l'infection initiale			
	90 à 220 jours		plus de 330 jours	
	KONO	TOMA	KONO	TOMA
Nulle ou faible	3	3	1	3
Forte	3	0	5	3

.../..

En effet, si les 3 équidés infectés depuis moins de 220 jours, lors de l'inoculation d'épreuve, se sont montrés entièrement sensibles, à Alfort, il en a été de même pour 3 chevaux sur les 6 infectés depuis plus de 330 jours.

L'ancienneté de l'infection semble donc être un facteur favorable pour la résistance à l'inoculation, mais non régulièrement suffisant.

2) Vis-à-vis de la même souche

KONO et coll. (1973) ont constaté une résistance totale de 8 chevaux lors de réinoculation par la même souche. Cependant, ils n'ont pas précisé si les inoculums initial et ultérieur

étaient strictement identiques,

provenaient d'un même cheval, à des dates différentes,

provenaient de chevaux différents.

Nos expériences ont été conduites avec des virus correspondant aux deux derniers de ces 3 cas. Elles nous ont amené à constater une différence dans le comportement des chevaux déjà infectés par la souche Wyoming et soumis à une réinoculation : lorsque le virus provient de l'animal ayant fourni le premier prélèvement (mais à une date différente) les équidés se sont révélés résistants. Il faut toutefois nuancer ce résultat, car il a été obtenu sur des équidés déjà soumis à plusieurs injections de virus. Il serait intéressant de le vérifier sur des animaux ne recevant en tout que deux injections de virus.

Lorsque le virus provient d'un autre animal, la réponse a été variée mais s'est parfois traduite par une entière sensibilité.

On constate cette différence de comportement, par exemple lors de l'épreuve des chevaux Sy et Retz par la souche Wyoming. Tous deux, infectés initialement par une souche française de virus AIE dans les conditions naturelles, ont reçu ultérieurement (mais à des dates différentes après l'infection initiale) une première injection de la souche Wyoming (stade Mélanose), puis une seconde injection (stade Géronimo). A la suite de la seconde injection de la souche Wyoming, le cheval Retz a présenté une crise aiguë d'AIE au 4ème jour tandis que l'état du cheval Sy n'était guère modifié. Cet exemple illustre d'ailleurs la différence de réponse constatée non seulement entre deux équidés, mais aussi pour un même équidé, au cours du temps, puisque le cheval Retz n'a été malade qu'après la seconde infection par la souche Wyoming.

Cet exemple montre également la précocité de la réponse clinique à une

.../..

inoculation d'un cheval déjà infecté (la crise est apparue 4 jours après l'épreuve), à rapprocher du phénomène déjà évoqué pour les poneys producteurs de sérum anti G ou anti C.

Les résultats que nous avons obtenus lors d'injection de souche homologue de virus AIE à des équidés déjà infectés diffèrent donc partiellement de ceux de KONO et coll. (1973) qui, dans ces conditions, avaient enregistré une résistance des équidés.

Force nous est de reconnaitre, comme d'autres Auteurs antérieurement, que le mécanisme déterminant la sensibilité ou la résistance d'un équidé infecté par une souche de virus AIE, à une réinoculation, nous échappe.

Pour KONO, une immunité cellulaire, d'installation plus lente que l'immunité humorale, serait responsable de la résistance, même en l'absence d'anticorps neutralisant la souche d'épreuve. Les résultats enregistrés lors de l'injection de sérum antilymphocytaire au cheval Retz ont montré que la diminution de la population lymphocytaire ne suffit pas forcément pour que le virus se multiplie, à l'inverse de ce qu'a constaté KONO avec des immunodépresseurs chimiques.

Le rôle de l'ancienneté de l'infection devrait être précisé par l'étude d'un plus grand nombre de chevaux infectés depuis plusieurs années et soumis à une inoculation d'épreuve.

La résistance, paradoxale en fonction des résultats de KONO sur la variation antigénique *in vivo* du virus, que nous avons constatée chez les équidés infectés une seconde fois par le virus provenant du même animal que la première fois devrait être étudiée de nouveau. Des essais ont été commencés, mais ils se heurtent à l'importance du nombre d'équidés nécessaires et à l'évolution souvent imprévisible d'une première infection qui peut se terminer par la mort.

Il serait souhaitable de disposer de prélèvements provenant d'équidés ayant présenté une succession de crises, comme Géronimo ou Eden.

Certains équidés recevraient au jour 0 le virus de la crise 1, d'autres celui de la crise 3 ou 4, d'autres enfin le virus de la crise 8. Après l'évolution de la maladie et l'installation d'un état apparemment normal pendant plusieurs mois, les animaux seraient infectés de la façon suivante :

1 puis 1

1 puis 3

1 puis 8

à l'inverse

8 puis 8

8 puis 3

8 puis 1

.../..

Dans ces conditions, et à l'inverse de ce que nous avons constaté avec des chevaux infectés déjà à plusieurs reprises, les équidés devraient se révéler sensibles à la réinoculation (sauf par le virus exactement identique).

De la même façon, il serait intéressant d'essayer de produire des mutants obtenus en culture cellulaire sous la pression immunologique d'anticorps, à l'instar de ce qui a été réalisé par HANNOUN pour le virus grippal humain. L'expérience consisterait à vérifier si l'on obtient en culture cellulaire, à partir du virus de départ et grâce à des échantillons de sérum prélevés sur un équidé infecté initialement par lui, la même série de variations antigéniques que chez cet animal. Une autre question qui se pose est de savoir si un même virus de départ, inoculé à un groupe d'équidés et entrainant chez chacun une série de crises, subirait ou non la même évolution antigénique chez chacun ou chez plusieurs d'entre eux.

Quoiqu'il en soit, les résultats obtenus jusqu'à présent amènent à reconnaitre :

- la variabilité individuelle de réponse des équidés à une réinfection par le virus AIE,
- l'impossibilité actuelle d'en maitriser les origines,
- le maintien de la sensibilité à la réinoculation de souche hétérologue ou homologue,
- et, par suite, l'impossibilité de proposer, par l'instant, une solution valable pour immuniser les équidés contre l'AIE.

C O N C L U S I O N

Au cours de nos recherches, nous avons abordé l'étude des précipitogènes du virus de l'anémie infectieuse des équidés (AIE), des précipitines correspondantes et de l'immunité anti AIE.

A l'étranger, d'autres équipes travaillent sur ces sujets et, au cours de ces dernières années, leurs résultats ont été publiés avant ou après les nôtres. Une partie de nos résultats est inédite et porte sur des aspects apparemment encore jamais étudiés, ou du moins publiés, par les autres équipes travaillant sur l'AIE.

Par suite, nous diviserons notre conclusion en 3 parties :

. la première évoquera l'essentiel des résultats obtenus à l'étranger sur les thèmes qui ont été également abordés à Alfort ;

. la seconde résumera les résultats obtenus à Alfort sur ces mêmes thèmes ;

. la troisième présentera les résultats originaux.

1) Résultats obtenus récemment, dans le monde

Un précipitogène (que nous avons appelé G car la ligne de précipité se forme près de la source d'antigène, pour le différencier d'un second précipitogène, mis en évidence à Alfort et nommé C en raison de la situation de la ligne de précipité près de la source d'anticorps) spécifique de l'AIE et commun à toutes les souches de virus AIE a été produit *in vivo* et en culture cellulaire. Il est utilisé pour le dépistage et le diagnostic de l'AIE et ses principales caractéristiques ont été précisées après purification : il s'agit, d'après NORCROSS et COGGINS, d'une protéine thermolabile de poids moléculaire 27.500, de densité 1,18, de constante de sédimentation 2,1 S et de pH 5,8. Le précipitogène G a été titré par immunodiffusion radiale.

L'évolution des précipitines anti G chez les équidés adultes et chez le poulain a été étudiée. Ces anticorps ont une constante de sédimentation de 7 S.

Dans le sérum des chevaux infectés on constate une diminution du rapport albumines/globulines, avec une augmentation des gamma globulines, en particulier des gamma globulines les plus rapides. Ces modifications du protéinogramme des chevaux infectés sont néanmoins inconstantes.

L'immunofluorescence directe ou indirecte réalisée sur frottis de rate de cheval et sur culture de leucocytes infectés a permis de préciser la distribution ou de suivre le développement des antigènes viraux dans les cellules.

.../..

Aucune immunité anti AIE n'a été obtenue jusqu'à présent à l'aide de vaccins à virus inactivé ou de vaccin à virus modifié. KONO a établi l'existence de variations antigéniques d'une même souche virale au cours de l'évolution de l'infection chez un équidé. Lors de réinoculation par une souche homologue ou hétérologue, les équidés infectés par une souche de virus AIE présentent un comportement variable, allant de la sensibilité complète jusqu'à l'entière résistance.

2) Résultats obtenus à Alfort sur ces thèmes

a) Le précipitogène G

A Alfort, le précipitogène G a été produit *in vivo* et retrouvé dans la rate de 23 équidés sur les 25 employés, en général en quantité supérieure à celle du précipitogène C. L'analyse de différents paramètres (espèce animale, dose d'inoculum, utilisation de dexaméthasone, intensité et précocité de la réponse thermique) révèle la prépondérance d'une sensibilité individuelle dans la production du précipitogène G chez les équidés infectés.

On peut mettre également en évidence le précipitogène G dans le poumon (15 fois sur 18 cas étudiés) et divers organes des équidés infectés : coeur, reins, foie, ganglions lymphatiques, thymus...

Le précipitogène G produit sur culture de cellules E.D. infectées possède les mêmes propriétés que celui d'origine splénique. Tous deux sont spécifiques du virus AIE, communs à toutes les souches, thermolabiles (détruits après chauffage pendant une heure à 50°C) détruits par les pH acides (inférieurs à 2) ou basiques (supérieurs à 10).

Le précipitogène G est une molécule protéique de poids moléculaire 27.500, de pH isoléectrique voisin de 6. Nos résultats diffèrent de ceux de NORCROSS et COGGINS quant à la densité et au coefficient de sédimentation du précipitogène G : pour la première, nous avons établi qu'elle était de 1,29 $\pm$ 2 p. cent (1,18 pour NORCROSS et COGGINS), pour le second, de 2,4 S $\pm$ 5 p. cent (2,1 S pour ces Auteurs).

b) Les précipitines anti G

La cinétique d'apparition et d'évolution des précipitines anti G a été étudiée sur équidés sains issus de mère infectée et sur équidés infectés dans les conditions naturelles ou expérimentales.

Les précipitines anti G apparaissent entre 11 et 57 jours après l'infection par le virus AIE. Les sidéroleucocytes apparaissent en général dans le sang circulant après les précipitines anti G. Ultérieurement, on

.../..

constate des fluctuations du taux des précipitines avec, le plus souvent, une diminution pendant la crise et une augmentation dans les jours suivants, accompagnée de l'augmentation des sidéroleucocytes.

De même, les modifications du protéinogramme sérique ne sont décelables, en général, qu'après les précipitines anti G. Parfois, l'augmentation des gamma globulines sériques, en particulier de la fraction la plus rapide, est contemporaine de l'apparition des anticorps anti G. Entre les crises d'AIE, le protéinogramme tend à revenir vers l'image précédant l'infection. Lors d'une nouvelle crise, on constate de nouveau une augmentation des gamma globulines, d'abord rapides puis de la fraction la plus lente. Chez les équidés atteints d'AIE chronique, le taux des gamma globulines peut atteindre 60 p. cent.

Nous n'avons jamais constaté la disparition des précipitines anti G chez les équidés infectés, même 8 ans après l'infection initiale.

3) Résultats originaux

a) Le précipitogène C

A côté du précipitogène G, nous avons démontré l'existence d'un précipitogène C, spécifique du virus AIE, commun à toutes les souches, produit en plus faible quantité et plus labile que le précipitogène G.

Il a été produit régulièrement *in vivo* (présent dans la rate de 24 équidés sur les 25 utilisés). Sa synthèse est généralement parallèle à celle du précipitogène G mais il peut n'être élaboré que beaucoup plus tardivement (résultat obtenu sur un poney).

On retrouve le précipitogène C dans divers autres organes des équidés infectés par le virus AIE : poumon (14 fois sur 18 cas étudiés), reins, foie, ganglions lymphatiques, thymus.

Il est également produit en culture de cellules E.D. chroniquement infectées.

Une technique d'immunodiffusion radiale employant un antigène C de référence a permis de titrer les différents lots d'antigène C, de préciser le rendement de différentes techniques d'isolement du précipitogène (précipitation par le sulfate d'ammonium entre 60 et 100 p. cent, chromatographie sur DEAE cellulose, gelfiltration sur ACA 54) et d'apprécier sa purification en déterminant le rapport : activité en immunodiffusion radiale/concentration en protéines.

Le précipitogène C est une petite molécule protéique de poids moléculaire de 20.000 environ, de densité apparente en chlorure de césium 1,29 $\pm$ 2 p. cent,

.../..

de coefficient de sédimentation 1,7 S ± 5 p. cent et de pHi voisin de 9.

L'absence de communauté antigénique entre les précipitogènes C et G a été démontrée par différentes techniques : préparation de sérums monovalents anti C ou anti G, absorption de sérum anti bivalent sur l'un ou l'autre précipitogène, obtention de croisement des lignes de précipité C -anti C et G -anti G dans différentes conditions techniques.

Le précipitogène C possède les mêmes propriétés qu'il soit d'origine splénique ou cellulaire.

b) Le précipitogène G

Nous avons montré que l'âne pouvait être un excellent producteur de précipitogène G.

Le précipitogène G d'origine splénique a été soumis à une séquence de techniques destinées à son isolement et à sa purification : précipitation au sulfate d'ammonium (22-40 p. cent), chromatographie sur DEAE cellulose, gelfiltration sur ACA 54. Le rendement de chaque technique et la purification apportée ont été déterminés grâce à l'immunodiffusion radiale par rapport à un antigène G de référence et au calcul du rapport : activité en immunodiffusion radiale/concentration en protéines.

Le précipitogène G d'origine cellulaire a été purifié sur ACA 54.

c) Les précipitines anti C

Les modalités d'apparition puis d'évolution des précipitines anti C ont été établies sur équidés sains, nés de mère infectée, sur équidés infectés dans les conditions naturelles ou expérimentales par le virus AIE et sur équidé recevant des injections du précipitogène C.

En règle générale, les précipitines anti C apparaissent plus tard (de quelques jours à plusieurs mois) et se maintiennent à un taux plus faible que les précipitines anti G. Chez les poulains sains nés de mère infectée, elles disparaissent avant les précipitines anti G. Sur un seul poney infecté, les précipitines anti C ne sont pas apparues.

Au cours de l'infection, le taux des précipitines anti C subit des fluctuations le plus souvent parallèles à celles des précipitines anti G. Sur un seul équidé infecté depuis plusieurs années, le taux des précipitines anti C, initialement faible, a diminué jusqu'à s'annuler au cours de l'évolution d'une forme chronique intense.

Un sérum monovalent anti C a été produit sur poney. Il contient des précipitines anti C et des anticorps révélables par immunofluorescence

.../..

indirecte sur cellules E.D. infectées chroniquement par le virus AIE.

La localisation des antigènes AIE au cours de l'infection de ces cellules a été étudiée en immunofluorescence indirecte à l'aide de sérums anti G ou anti C ou bivalents. Les aspects obtenus sont les mêmes avec ces différents sérums.

Le sérum des équidés infectés par le virus AIE fournit en général une réponse positive en immunofluorescence avant qu'apparaissent les précipitines anti C.

De même, les modifications du protéinogramme sérique de ces animaux sont souvent constatées avant l'apparition des précipitines anti C.

Les classes des immunoglobulines anti C chez des équidés infectés et les variations au cours du temps du taux des immunoglobulines sériques anti C de chaque classe ont été déterminées après chromatographie des sérums sur DEAE cellulose. L'activité précipitante anti C est trouvée essentiellement dans les fractions contenant les IgG et les IgT. Lors d'évolution d'une série de crises d'AIE, le rôle des IgT augmente progressivement pour devenir prépondérant. Dans le colostrum de jument infectée, la majorité de l'activité précipitante anti C est située dans les fractions contenant les IgG et les IgT. La fraction contenant les IgM et les IgA secrétoires ne possède qu'une faible activité anti C.

d) Les précipitines anti G

Des sérums précipitants monovalents anti G ont été produits sur des poneys. Ils ont été étudiés en immunofluorescence indirecte sur des cellules E.D. infectées, en parallèle avec les sérums anti C et les sérums d'équidés infectés.

Les précipitines anti G sont décelables dans le sérum au même moment que ou un peu avant les anticorps révélés par immunofluorescence indirecte.

La classe des immunoglobulines anti G a été déterminée. Les résultats sont très proches de ceux obtenus pour les précipitines anti C.

e) L'immunité anti AIE

Les équidés possédant de forts taux de précipitines anti G ou anti C à la suite d'injection des précipitogènes correspondants, se révèlent entièrement sensibles à une inoculation d'épreuve.

Des équidés infectés par une souche de virus AIE se montrent également sensibles à l'inoculation par une souche hétérologue, effectuée de quelques mois à plusieurs années après l'infection initiale. Cependant certains résistent.

.../...

Des équidés infectés par une souche de virus AIE sont réceptifs à l'inoculation de la même souche provenant d'un animal donneur de virus, différent du premier. En revanche, ils se montrent résistants lorsque le cheval donneur est identique bien que le prélèvement soit effectué lors d'une autre crise que pour l'infection antérieure. Cependant, ces résultats ont été obtenus sur des équidés infectés à plusieurs reprises et doivent donc être contrôlés sur des animaux ayant reçu antérieurement une seule inoculation.

L'emploi de gamma globulines anti lymphocytes de cheval n'a pas suffi à faire apparaitre une crise nette d'AIE sur un cheval infecté.

L'absence d'immunité constatée contre une souche hétérologue, voire homologue, empêche actuellement l'immunisation anti AIE, impose la poursuite d'expériences coûteuses pour en préciser les limites et rend malaisée la recherche d'une solution d'avenir dans ce domaine.

BIBLIOGRAPHIE

ANDRIEVSKII (I.) (1939). Immunité dans l'anémie infectieuse des équidés. Sovyet. Vet., 16, 25-28.

AUDIBERT (F.) et SANDOR (G.) (1972). Etude de l'antitoxine majeure des sérums équins (IgT) en rapport avec les autres immunoglobulines présentes dans ces sérums. Ann. Inst. Pasteur, 122, 221-249.

AUGUST (J.T.), BOLOGNESI (D.P.), FLEISSNER (E.), GILDEN (R.V.) et NOWINSKI (R.C.) (1974). A proposed nomenclature for the virion proteins of oncogenic RNA viruses. Virology, 60, 595-601.

BALOZET (L.) (1934). Au sujet de l'immunité dans l'anémie infectieuse. C.R. Ac. Sci. Paris, 198, 992-993.

BALOZET (L.) (1935). Effet de réinoculations chez l'âne du virus de l'anémie infectieuse. C.R. Soc. Biol., 119, 160-162.

BALOZET (L.) (1936 a). Action de la glycérine sur la virulence de la rate dans l'anémie infectieuse. C.R. Soc. Biol., 122, 283-286.

BALOZET (L.) (1936 b). Etudes expérimentales sur l'anémie infectieuse des équidés. III. Essais négatifs de prémunisation par l'emploi de la rate virulente, glycérinée ou phéniquée. Arch. Inst. Pasteur Tunis, 25, 272-283.

BANKIER (J.C.) (1945). Equine infectious anemia. Attempted vaccination with crystal violet tissue vaccine. Canad. J. Comp. Med. Vet. Sci., 9, 197-199.

BOULANGER (P.), BANNISTER (G.L.) et CARRIER (S.P.) (1972). Equine infectious anemia : preparation of a liquid antigen extract for the agar gel immunodiffusion and complement fixation test. Canad. J. Comp. Med., 36, 116-123.

BURNS (S.J.) (1974). Equine infectious anemia : plasma clearance times of passively transferred antibody in foals. J.A.V.M.A., 164, 64-65.

CARRE (H.) et RINJARD (P.) cités par CARRE (H.) et VERGE (J.) (1935). Les anémies infectieuses des animaux domestiques. Bull. Off. Int. Epiz., 10, 87-150.

CARRE (H.) et VALLEE (H.) (1907). Recherches cliniques et expérimentales sur l'anémie pernicieuse du cheval (typhoanémie infectieuse). Rev. Gén. Méd. Vét., 9, 113-124.

CARRIER (S.P.), BANNISTER (G.L.) et BOULANGER (P.) (1972). Equine infectious anemia : activity of liquid antigen extracts in the agar gel immunodiffusion and complement fixation tests. Canad. J. Comp. Med., 36, 377-379.

CARRIER (S.P.), BOULANGER (P.) et BANNISTER (G.L.) (1973). Equine infectious anemia : sensitivity of the agar gel immunodiffusion test, and the direct and the indirect complement fixation tests for the detection of antibodies in equine serum. Canad. J. Comp. Med., 37, 171-176.

CHARY (R.) et DUFOUR (R.) (1965). Recherches sur la constitution protéique des sérums animaux. II. Analyse électrophorétique du sérum du cheval. Rev. Serv. Biol. Vét., 18, 173-179.

.../..

COGGINS (L.) (1974). Evaluacion de la prueba de immunodifusion para el diagnostico de AIE. Premier Symposium sur l'AIE, Caracas, p. 126-131.

COGGINS (L.) et NORCROSS (N.L.) (1970). Immunodiffusion reaction in equine infectious anemia. Corn. Vet., 60, 330-335.

COGGINS (L.), NORCROSS (N.L.) et KEMEN (M.J.) (1973). The technique and application of the immunodiffusion test for equine infectious anemia. Proc. 3rd. Int. Conf. Equine Infectious Diseases, Paris, 1972, p. 189-198, Karger-Basel.

COGGINS (L.) et PATTEN (V.) (1971). Immunodiffusion test for equine infectious anemia. J.A.V.M.A., 158, 228.

Commission Japonaise (1914). Tokyo, the horse administration bureau.

CRAWFORD (T.B.), Mc GUIRE (T.C.) et HENSON (J.B.) (1971). Detection of equine infectious anemia virus in vitro by immunofluorescence. Arch. Ges. Virusf., 34, 332-339.

DE KOCK (G.) (1920) cité par DREGUSS (M.N.) et LOMBARD (L.S.) (1954).

DITCHFIELD (J.) (1967). Equine infectious anemia. A review of the disease and diagnostic tests. Canad. Vet. Jour., 8, 273-278.

DREGUSS (M.) et LOMBARD (L.) (1954). Experimental studies in equine infectious anemia. Un vol., University of Pennsylvania Press éd., Philadelphia, 203 p.

FAZEKAS DE ST GROTH (S.) et HANNOUN (C.) (1973). Sélection par pression immunologique de mutants dominants du virus de la grippe A (Hong Kong). C.R. Acad. Sc. Paris, 276 D, 1917-1920.

FRITSCH (A.) (1973). Properties of various rotors used for zone centrifugation. Anal. Biochem., 55, 57-71.

GORET (P.), MICHEL (C.) et TOMA (B.) (1968). L'anémie infectieuse des équidés. Un vol., l'Expansion éd. Paris, 143 p.

GORET (P.), TOMA (B.), BIND (J.L.) et LUKA ISKANDER (G.E.) (1969). Recherches sur l'anémie infectieuse des équidés. I. Identification sur le cheval de course. Isolement de souches de virus. Rec. Méd. Vét., 145, 1055-1068.

GORET (P.), TOMA (B.) LUKA ISKANDER (G.E.) et BIND (J.L.) (1969). Recherches sur l'anémie infectieuse des équidés. II. Diagnostic de la forme latente par déclenchement des crises. Rec. Méd. Vét., 145, 1212-1227.

GORET (P.), TOMA (B.) et LUKA ISKANDER (G.E.) (1971). Possibilité et spécificité du séro-diagnostic de l'anémie infectieuse des équidés par précipitation en gélose. Technique et application au dépistage de l'infection chronique inapparente. C.R. Acad. Sc. Paris, 273 D, 2721-2724.

GUBIN (A.P.) et SHABUROV (M.S.) (1961). Foudn. Vseroyvz. Inst. eksp. Vet., 25, 181.

HART (L.T.) et BROUSSARD (E.A.) (1973). Extraction of equine infectious anemia immunodiffusion antigen with the aid of the chaotropic agent, thiocyanate. Appl. Microb., 25, 190-194.

.../..

HEMPEL (J.) (1909). Beiträge zur kenutnis der austeckenden Anamie der Pferde. Z. Infekt. Haustiere, 5, 381-434.

HENSON (J.B.), Mc GUIRE (T.C.), KOBAYASHI (K.) et GORHAM (J.R.) (1967). The diagnosis of equine infectious anemia using the complement fixation test, siderocyte counts, hepatic biopsies and serum protein alterations. J.A.V.M.A., 151, 1830-1839.

HENSON (J.B.), Mc GUIRE (T.C.) et GORHAM (J.R.) (1971). The detection of precipitating antibodies in equine infectious anemia and partial purification of the antigen. Arch. ges. Virusf., 35, 385-391.

HIRTZ (J.) (1952). Etude électrophorétique du sérum de chevaux infectés expérimentalement d'anémie infectieuse. Rev. Immun., 16, 397-405.

ISCAKI (S.) (1967). Etude immunologique des antitoxines antidiphtériques de cheval. Thèse Dr. Sc., Paris, 232 p.

ITO (Y.) (1974). Morphogenesis of equine infectious anaemia virus. Acta Virol., 18, 352-354.

ITO (Y.), KONO (Y.) et KOBAYASHI (K.) (1969). Electron microscopic observations of equine infectious anemia (EIA) virus in cultivated horse leucocyte. Arch. ges. Virusf., 28, 411-416.

KALJAKOW (J.E.) (1940) cité par STEIN (C.D.) et GATES (D.W.) (1950).

KANASHIRO (R.S.) (1974). Preparacion, purificacion parcial, caracterizacion del antigeno AIE obtenido a partir de un extracto de bazo para la deteccion de anticuerpos precipitantes. Premier Symposium sur l'Anémie Infectieuse des équidés, Caracas, p. 75-81.

KAO (K.Y.), REAGAN (R.L.) et BRUECKNER (A.L.) (1954). Electrophoretic study of the horse serum of equine infectious anemia. Am. J. Vet. Res., 15, 343-345.

KEMEN (M.J.) et COGGINS (L.) (1972). Equine infectious anemia transmission from infected mares to foals. J.A.V.M.A., 161, 496-499.

KLIMOV (N.M.), GUBIN (A.P.), MALAKHOV (A.G.) et SHABUROV (M.S.) (1961). Frudy Vsesoyvz Inst. eksp. Vet., 24, 33.

KOBAYASHI (K.) (1961 a). Studies on the cultivation of equine infectious anemia virus in vitro. I. Serial cultivation of the virus in the cultures of various horse tissues. Virus, 11, 177-189.

KOBAYASHI (K.) (1961 b). Studies on the cultivation of equine infectious anemia virus in vitro. II. Propagation of the virus in horse bone marrow cell culture. Virus, 11, 189-201.

KOBAYASHI (K.) (1961 c). Studies on the cultivation of equine infectious anemia virus in vitro. III. Propagation of the virus in horse leukocyte culture. Virus, 11, 249-256.

KOBAYASHI (K.), HENSON (J.B.) et GORHAM (J.R.) (1969). Neutralizing antibodies in equine infectious anemia. Fed. Proc., 28, 427.

.../..

KOBAYASHI (K.) et KONO (Y.) (1966 a). Serial passages of equine infectious anemia virus in horse leukocyte culture. Nat. Inst. An. Health Quart., 7, 1-7.

KOBAYASHI (K.) et KONO (Y.) (1966 b). Propagation and titration of equine infectious anemia virus in horse leukocyte culture. Nat. Inst. An. Health Quart., 7, 8-20.

KONO (Y.) (1969). Viremia and immunological responses in horses infected with equine infectious anemia virus. Nat. Inst. Anim. Health Quart., 9, 1-9.

KONO (Y.) (1973). Recurrences of equine infectious anemia. Approaches to an understanding of the mechanisms. Proc. 3rd int. Conf. Equine infectious diseases, Paris 1972, p. 175-186, Karger Basel.

KONO (Y.) (1973). Development of immunity after immunization and infection with avirulent, attenuated and virulent infectious anemia viruses. Proc. 3rd int. Conf. Equine infectious diseases, Paris 1972, p. 242-254, Karger Basel.

KONO (Y.), FUKUNAGA (Y.) et KOBAYASHI (K.) (1973). Resistance of horses infected chronically with equine infectious anemia virus against reinfection. Nat. Inst. Anim. Health Quart., 13, 173-181.

KONO (Y.) et KOBAYASHI (K.) (1966 a). Complement fixation test of equine infectious anemia. I. Specificity of the test. Nat. Inst. Anim. Health Quart., 6, 194-203.

KONO (Y.) et KOBAYASHI (K.) (1966 b). Complement fixation test of equine infectious anemia. II. Relationship between CF antibody response and the disease. Nat. Inst. Anim. Health Quart., 6, 204-207.

KONO (Y.) et KOBAYASHI (K.) (1970). Changes in pathogenicity of equine infectious anemia virus during passages in horse leukocyte culture. Nat. Inst. Anim. Health Quart., 10, 106-112.

KONO (Y.), KOBAYASHI (K.) et FUKUNAGA (Y.) (1970 b). Immunization of horses against equine infectious anemia with an attenuated EIA virus. Nat. Inst. Anim. Health Quart., 10, 113-122.

KONO (Y.) KOBAYASHI (K.) et FUKUNAGA (Y.) (1971). Serological comparison among various strains of equine infectious anemia virus. Arch. ges. Virusf., 34, 202-208.

KONO (Y.), KOBAYASHI (K.) et FUKUNAGA (Y.) (1973). Antigenic drift of equine infectious anemia virus in chronically infected horses. Arch. ges. Virusf., 41, 1-10.

KONO (Y.) et TANIGUCHI (T.) (1974). Unsuccessful attempts to propagate equine infectious anemia virus in lambs and small experimental animals. Nat. Inst. Anim. Health Quart., 14, 206-207.

KONO (Y.), YOSHINO (T.) et FUKUNAGA (Y.) (1970). Growth characteristics of equine infectious anemia virus in horse leukocyte cultures. Arch. ges. Virusf., 30, 252-256.

.../..

KONO (Y.) et YOSHINO (T.) (1974). Propagation of equine infectious anemia virus in horse kidney cell cultures. Nat. Inst. Anim. Health Quart., 14, 155-162.

LARS RYDEN (1975). On equine infectious anemia. A serological and field study. Thèse, Stocklolm.

LAVERGNE (M.) et RAYNAUD (M.) (1973). Etude des immunoglobulines de cheval de type agrégeable (AI ou IgB ou IgI). Ann. Immun. (Inst. Pasteur), 124 C, 45-74.

LEHNERT (E.) (1929). Report on studies in infectious anemia of horses during 1923 to 1928. Skand. Vet. Tidskr., 19, 205.

LIVINGSTON (C.W.), MOORE (R.W.) et REDMOND (H.E.) (1966). A diagnostic precipitin test for equine infectious anemia. The Southwestern Vet., 19, 221-222.

LOWRY (O.M.), ROSEBROUGH (N.J.), FARR (A.L.) et RANDALL (R.J.) (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 265-275.

LUHRS (E.) (1919). Die ansteckende Blutarmut der Pferde. Z. Vet. Kunde, 31, 369 ; 450.

LUKA ISKANDER (G.) (1972). Recherches virologiques, sérologiques et immunologiques sur l'anémie infectieuse des équidés. Application au diagnostic et enquête épidémiologique en France. Thèse Dr. Sc., Lille.

LUKA ISKANDER (G.E.), TOMA (B.) et GORET (P.) (1970). Recherches sur l'anémie infectieuse des équidés. III. Mise au point d'une technique de culture des leucocytes de cheval. Rec. Méd. Vét., 146, 401-414.

MALMQUIST (W.A.), BARNETT (D.) et BECVAR (C.S.) (1973). Production of equine infectious anemia antigen in a persistently infected cell line. Arch. ges. Virusf., 42, 361-370.

MARTIN (L.A.) (1939). L'inoculation et le premier accès thermique au cours de l'anémie infectieuse expérimentale des équidés. Ann. Inst. Past. Paris, 62, 595-615.

MARTIN (L.A.) (1940). L'anémie infectieuse des équidés. IV. Adsorption du virus. Tentatives d'atténuation du virus adsorbé. Arch. Inst. Pasteur Maroc, 2, 305.

MARTIN (R.G.) et AMES (B.N.) (1961). Method for determining the sedimentation behaviour of enzymes. Application to protein mixtures. J. Biol. Chem., 236, 1372-1379.

Mc GUIRE (T.C.), CRAWFORD (T.B.) et HENSON (J.B.) (1971). Immunofluorescent localization of equine infectious anemia virus in tissue. Am. J. Path., 62, 283-292.

Mc GUIRE (T.C.), CRAWFORD (T.B.) et HENSON (J.B.) (1972). Equine infectious anemia : detection of infectious virus-antibody complexes in the serum. Immun. Comm., 1, 545-551.

.../..

Mc GUIRE (T.C.), CRAWFORD (T.B.) et HENSON (J.B.) (1973). The isolation, characterisation and fonctional properties of equine immunoglobulin classes and subclasses. Proc. 3rd. Int. Conf. Equine Infectious Diseases, Paris 1972, p. 364-381, Karger Basel ed.

Mc GUIRE (T.C.), PERRYMAN (L.D.) et HENSON (J.B.) (1970). Immunoglobulin composition of the hypergammaglobulonemia of equine infectious anemia. Fed. Proc., 29, 1072.

Mc GUIRE (T.C.), VAN HOOSIER (G.L.) et HENSON (J.B.) (1971). The complement fixation reaction in equine infectious anemia : demonstration of inhibition by IgG (T). J. Immun., 107, 1738-1744.

MITCHELL (C.A.), HUMPHREYS (F.A.) et WALKER (R.V.L.) (1944). Equine infectious anemia. An outbreak in the Ottawa valley. Canad. J. Comp. Med., 8, 165-183.

MITEV (G.) et VASSILEVA (L.) (1960). Etude électrophorétique des sérums de chevaux infectés expérimentalement par le virus de l'anémie infectieuse des équidés. Ac. Sc. Bulg., 99, 105.

MONTEVERDE (J.J.) (1973). Anemia infecciosa equina. Diagnostico serologico especifico. Ac. Nac. Agr. Vet. Bs. As., 27, 53-73.

MONTGOMERY (P.C.) (1973). Molecular aspects of equine antibodies. Proc. 3rd. Int. Conf Equine Infectious Diseases, Paris 1972, p. 343-363, Karger Basel ed.

MOORE (R.W.), LIVINGSTON (C.W.) et REDMOND (H.E.) (1966). Equine infectious anemia. I. Preparation and preliminary investigation of a precipitogen for equine infectious anemia. The Southwestern Vet., 19, 187-191.

MORGAN (D.O.) (1973). Immunodiffusion test for equine infectious anemia. Proc. 3rd. int. Conf. Equine Infectious Diseases, Paris 1972, 222-227, Karger Basel.

MYERS (W.L.), SEGRE (D.) et EL-ZEIN (A.) (1969). Equine infectious anemia : reports of progress in research. J.A.V.M.A., 155, 352-354.

NAKAJIMA (H.) (1973). Immunodiffusion studies in equine infectious anemia and their evaluation for diagnosis. Proc. 3rd int. Conf. Equine Infectious Diseases, Paris 1972, 199-214, Karger Basel.

NAKAJIMA (H.) (1974). Diagnostic de l'anémie infectieuse des équidés par l'immunodiffusion en gélose. Compte rendu du premier Symposium International sur l'anémie infectieuse des équidés, Caracas, p. 90-100.

NAKAJIMA (H.), FUKUNAGA (Y.) et USHIMI (C.) (1974). Titration of precipitating antibody in equine infectious anemia. Nat. Inst. Anim. Health Quart., 14, 1-8.

NAKAJIMA (H.), MIZUNO (Y.), YASUDA (K.) et USHIMI (C.) (1972). Physicochemical studies of equine infectious anemia virus. V. Effect of ultra-violet irradiation on virus infectivity. Arch. ges. Virusf., 41, 135-137.

NAKAJIMA (H.), NORCROSS (N.L.) et COGGINS (L.) (1972). Demonstration of antigenic identity between purified equine infectious anemia virus and an antigen extracted from infected horse spleen. Inf. Imm., 6, 416-417.

.../..

NAKAJIMA (H.) et OBARA (J.) (1964). Ether susceptibility of equine infectious anemia virus. Nat. Inst. Anim. Health. Quart., 4, 129-134.

NAKAJIMA (H.), TANAKA (S.) et USHIMI (C.) (1969). Physicochemical studies of equine infectious anemia virus. I. Broyant density of the virus. Arch. ges. Virusf., 26, 389-394.

NAKAJIMA (H.), TANAKA (S.) et USHIMI (C.) (1969). Physicochemical studies of equine infectious anemia virus. II. Sensitivity of the virus to trypsin. Arch. ges. Virusf., 26, 395-397.

NAKAJIMA (H.), TAJIMA (M.), TANAKA (S.) et USHIMI (C.) (1969). Physicochemical studies of equine infectious anemia virus. III. Purification and electron microscopic observation of the virus. Arch. ges. Virusf., 28, 348-360.

NAKAJIMA (H.), TANAKA (S.) et USHIMI (C.) (1970). Physicochemical studies of equine infectious anemia virus. IV. Determination of the nucleic acid type in the virus. Arch. ges. Virusf., 31, 273-280.

NAKAJIMA (H.) et USHIMI (C.) (1971). Immunodiffusion studies of purified equine infectious anemia virus. Inf. Immun., 3, 373-377.

NAKAJIMA (H.) et USHIMI (C.) (1972). Detection of precipitating antibody in equine infectious anemia by concentrated virus antigen. Nat. Inst. Anim. Health Quart., 12, 47-53.

NAKAJIMA (H.), USHIMI (C.), FUKUNAGA (Y.) et HIRASAWA (K.) (1973). Preparation of equine infectious anemia virus antigen for immunodiffusion test. Arch. ges. Virusf., 42, 339-345.

NORCROSS (N.L.) et COGGINS (L.) (1971). Characterization of an equine infectious anemia antigen extracted from infected horse spleen tissue. Inf. Immun., 4, 528-531.

PAPADOPOULOS (1973). Epizootiological situation of equine infectious anemia in Greece. Deuxième Congrès Mondial de l'Association internationale des Vétérinaires microbiologistes, immunologistes et spécialistes des maladies infectieuses, Varna (Bulgarie). Vet. Sci., 1975, 12, 134.

PEARSON (J.E.) (1971). Protocol for the immunodiffusion (COGGINS) test for equine infectious anemia. U.S. Government printing office.

PEARSON (J.E.), BECVAR (C.S.) et MOTT (L.O.) (1970). Evaluation of the immunodiffusion test for the diagnosis of equine infectious anemia. Proc. U.S. Anim. Health Ass., 74, 260-267.

PETROVIC (D.), LULIC (V.) et ZELEZNIK (Z.) (1972). A contribution to the diagnostic of equine infectious anemia. Viral replication in a line culture of human fetal lung fibroblasts WI-38. Vet. Arch., 42, 113-120.

PETROVIC (D.), ZUPANCIC (Z.) et JUKIC (B.) (1973). Situation épidémiologique de l'anémie infectieuse en Yougoslavie. Deuxième Congrès Mondial de l'Association Internationale des Vétérinaires microbiologistes, immunologistes et spécialistes des maladies infectieuses, Varna (Bulgarie), Vet. Sci., 1975, 12, 131-132.

.../..

QUENTIN (M.) (1933). Recherches cliniques sur la typho-anémie infectieuse des équidés. Essais de vaccination. Rev. Gén. Méd. Vét., 42, 321-376.

RAYNAUD (M.) et ISCAKI (S.) (1970). Classification of equine immunoglobulins. International Symposium on Antilymphocyte serum, Versailles 1970, Symp. Series Immun. Standard., 16, 101-124. Karger Basel.

RAMON (G.) et LEMETAYER (E.) (1934). Essais sur l'anémie infectieuse du cheval. C.R. Ac. Sc., 198, 508-510.

REIS (R.) (1974). Prevalencia y control de la AIE en el Estado de Minas Gerais, Brasil. Premier Symposium international sur l'Anémie infectieuse des équidés, Caracas, p. 169-171.

RIBEIRO-NETTO (A.), HAETINGER (H.), PEREIRA-LIMA (F.), LUZ (J.B.) et MACRUZ (R (1970). Serum proteins as a screening test for equine infectious anemia. Zentbl. Vet. Med., 17 B, 739 746.

RUSSELL (L.H.), LIVINGSTON (C.W.) et MOORE (R.W.) (1966). Equine infectious anemia. III. Comparison of alterations in serum proteins to results of the precipitin test. South. Vet., 19, 207-216.

SALMON (H.), GORET (P.) et RIVIERE (Y.) (1973). Caractérisation et particularités des lymphocytes T du porc. C.R. Acad. Sci., Paris, 277 D, 471-474.

SAXER (E.) et FUENTES (R.) (1960). Neuere Aspekte der Serologie bei der infektiösen Anämie der Einhufer. Schweiz. Arch. Tierheilk., 102, 232.

STEIN (C.D.) et GATES (D.W.) (1950). The neutralizing effect of antiserum from recovered carriers of equine infectious anemia of the virus of the disease. Vet. Med., 45, 152-156.

STEIN (C.D.), MOTT (L.O.) et GATES (D.W.) (1955). Some observations on carriers of equine infectious anemia. J.A.V.M.A., 126, 277-286.

STEIN (C.D.) et OSTEEN (O.L.) (1941). Studies on immunization in equine infectious anemia. Am. J. Vet. Res., 2, 344-348.

TABUCHI (E.), ISHII (S.) et SONODA (A.) (1957). Studies on the immunity of equine infectious anemia by the inoculation of larger volume of formolized viruses. Exp. Rep. Equine infec. anemia., N° 2, 71-80.

TAJIMA (M.), NAKAJIMA (H.) et ITO (Y.) (1969). Electron microscopy of equine infectious anemia virus. J. Virol., 4, 521-527.

TANAKA (K.) et SAKAKI (K.) (1962). Neutralization test on serum from horses infected with the virus of equine infectious anemia. Nat. Inst. Anim. Health Quart., 2, 128-139.

TOMA (B.) (1967). Diagnostic expérimental de l'anémie infectieuse : Recherche des sidéroleucocytes. Bull. Ass. Fr. Micr. Spéc. Mal. Inf., N° 2, 3-11.

TOMA (B.) et GORET (P.) (1972). Studies on the epidemiology of equine infectious anemia in Europe using the gel precipitation test. Proc. 3rd int. Conf. Equine Infectious Diseases, Paris 1972, p. 215-221 (Karger Basel 1973).

TOMA (B.) et GORET (P.) (1973). Etude des précipitogènes du virus de l'anémie infectieuse des équidés. C.R. Acad. Sc. Paris, 276 D, 1513-1515.

TOMA (B.) et GORET (P.) (1974). Etude sérologique de l'anémie infectieuse des équidés. I. Production des précipitogènes G et C. Bull. Acad. Vét., 47, 102-116.

TOMA (B.) et GORET (P.) (1974). Etude sérologique de l'anémie infectieuse des équidés. II. Etude cinétique des précipitines anti G et anti C. Bull. Acad. Vét., 47, 117-131.

TOMA (B.) et GORET (P.) (1974). Comportement des équidés atteints d'anémie infectieuse vis-à-vis de réinoculations. Rec. Méd. Vét., 150, 1037-1049.

TOMA (B.) et GORET (P.) (1975). Etude de l'anémie infectieuse des équidés par la technique d'immunofluorescence indirecte. Rec. Méd. Vét., 151, 499-504.

TOMA (B.), LAUDE (H.) et GORET (P.) (1975). Purification et étude des antigènes du virus de l'anémie infectieuse des équidés, produits in vivo ou en culture cellulaire. C.R. Acad. Sc. Paris

TOMA (B.), LUKA ISKANDER (G.E.) et GORET (P.) (1970). Recherches sur l'anémie infectieuse des équidés. IV. Etude du virus obtenu en culture de leucocytes de cheval. Rec. Méd. Vét., 146, 565-581.

TOMA (B.), LUKA ISKANDER (G.E.) et GORET (P.) (1971a), Sérodiagnostic de l'anémie infectieuse des équidés par précipitation en gélose. I. Mise au point de la technique. Bull. Acad. Vét., 44, 403-413.

TOMA (B.), LUKA ISKANDER (G.E.) et GORET (P.) (1971b), Sérodiagnostic de l'anémie infectieuse des équidés par précipitation en gélose. II. Premiers résultats d'une enquête épidémiologique en France. Bull. Acad. Vét., 44, 415-426.

TOMA (B.), LUKA ISKANDER (G.E.) et GORET (P.) (1972). Diagnostic de l'anémie infectieuse des équidés par la technique de précipitation en gélose. Essais de standardisation de l'antigène et de la technique. Progr. Immunobiol. Standard., 5, 532-536 (Karger Basel).

UEDA (S.), SAMEJIMA (T.), KURODA (S.) et NAKAMURA (J.) (1973). Preparation of equine infectious anemia antigens for diagnosis. Japan. J. Microbiol. 17, 393-399.

USHIMI (C.), NAKAJIMA (H.) et TANAKA (S.) (1970). Demonstration of equine infectious anemia viral antigen by immunofluorescence. Nat. Inst. Anim. Health Quart., 10, 90-91.

USHIMI (C.), HENSON (J.B.) et GORHAM (J.R.) (1972). Study of the one-step growth curve of equine infectious anemia virus by immunofluorescence. Inf. Immun., 5, 890-895.

VELU (H.), ZOTTNER (G.), FAURE (L.) et SARTHOV (1934). Essais de vaccination contre l'anémie infectieuse des équidés par virus formolé. Bull. Ac. Vét., 7, 155-157.

CONTRIBUTION A L'ETUDE IMMUNOLOGIQUE DE L'ANEMIE INFECTIEUSE

DES EQUIDES (AIE)

Page

Introduction 1

PREMIERE PARTIE : IMMUNOLOGIE DE L'AIE 3

I/ LE VIRUS AIE 5

A) Propriétés physico-chimiques du virus AIE 5

B) Culture du virus AIE 6

II/ LE PRECIPITOGENE DU VIRUS AIE 7

A) Production du précipitogène 8

1) *in vivo* 9
2) en culture cellulaire 14

B) Techniques d'étude du précipitogène 17

1) Immunodiffusion en gélose 17
a) Double diffusion 19
b) Immunodiffusion radiale 21

2) Détermination des propriétés physiques chimiques et biologiques 21
a) Etude des propriétés physiques et action des agents physiques 21
b) Etude des propriétés chimiques et action des agents chimiques 24
c) Etude des propriétés biologiques 24

C) Propriétés du précipitogène AIE 25

1) Propriétés physiques 26
2) Propriétés chimiques 26
3) Propriétés biologiques 26

III/ LES ANTICORPS ANTI AIE 28

A) Les immunoglobulines du cheval 28

1) Généralités 28
2) Etude systématique 28

B) Les immunoglobulines du cheval infecté par le virus AIE 29

1) Anticorps fixant le complément 30
2) Anticorps neutralisants 31
3) Anticorps précipitants 32
a) Evolution des anticorps précipitants 32
b) Nature des anticorps précipitants 33
c) Relations entre les anticorps neutralisants, fixant le complément et précipitants 33
4) Anticorps révélés par immunofluorescence 34

.../..

IV/ ELECTROPHOREGRAMME DU SERUM DES CHEVAUX ATTEINTS D'AIE 34

A) Etude électrophorétique du sérum de chevaux sains 35

1) Analyse des différentes fractions 35
2) Résultats quantitatifs 36

B) Etude électrophorétique du sérum de chevaux infectés par le virus AIE 37

V/ L'IMMUNITE DANS L'AIE 38

A) Immunisation contre l'AIE 38

1) Vaccins à virus inactivé 38
2) Vaccin à virus modifié 39

B) Comportement des chevaux déjà infectés 40

1) Résistance des équidés 40
2) Sensibilité des équidés 42

C) Phénomènes immunitaires 44

DEUXIEME PARTIE : MATERIEL ET METHODES 47

I/ MATERIEL 49

A) Animaux 49
B) Souches virales 50
C) Cultures cellulaires 50
D) Antigènes 51
E) Sérums et gamma globulines 51

II/ METHODES 54

A) Infection des équidés en vue de la production des précipitogènes 54

B) Préparation des extraits antigéniques 55

C) Immunodiffusion en gélose 56

D) Isolement, purification et étude des précipitogènes 60

1) Précipitation par le sulfate d'ammonium 60
2) Chromatographie sur DEAE cellulose 60
3) Gelfiltration sur Séphadex G 75 et sur ACA 54 61
4) Ultracentrifugation 62
5) Détermination du point isoélectrique 63
6) Action de la chaleur 63
7) Action du pH 64

E) Etude des anticorps anti AIE 64

1) Chromatographie sur DEAE cellulose 64
2) Gelfiltration sur Séphadex G 200 et Sépharose 4 B 65
3) Immunoélectrophorèse 66

F) Electrophorèse sur acétate de cellulose 66

G) Immunofluorescence indirecte 66

H) Recherche des sidéroleucocytes 67

I) Dosage des protéines 67

.../..

TROISIEME PARTIE : RESULTATS EXPERIMENTAUX 69

I/ ETUDE DES PRECIPITOGENES 71

A) Obtention des préparations antigéniques AIE 75

1) Organes d'équidés infectés 75
a) Présence des précipitogènes G et C dans la rate 75
b) Présence des précipitogènes dans d'autres organes 88
c) Etude quantitative du précipitogène G dans la rate 88
d) Etude quantitative du précipitogène C 99

2) A partir de culture cellulaire 99

B) Isolement et purification des précipitogènes G et C 101

1) Extraits d'origine splénique 101

2) Antigènes d'origine cellulaire 108

C) Propriétés des précipitogènes G et C 108

1) Spécificité antigénique de G et C 110

2) Comportement de G et C vis-à-vis de différents agents 111
a) Chaleur 111
b) pH 115
c) Electrophorèse 115

3) Caractéristiques physico-chimiques des précipitogènes G et C 119

II/ ETUDE DES PRECIPITINES ANTI AIE 120

A) Etude cinétique 120

1) Après infection expérimentale 120

2) Après infection naturelle 131
a) Equidés adultes 131
b) Poulains 134

3) Après injection des précipitogènes 134

4) Relations avec la cinétique des anticorps révélés par immunofluorescence indirecte 141
a) Antigènes AIE révélables par immunofluorescence 145
b) Anticorps anti AIE révélés par immunofluorescence 145

5) Relations avec l'évolution des modifications du protéinogramme sérique 154
a) Etude de cas particuliers 154
b) Résultats généraux 174

B) Nature des précipitines 175

III/ L'IMMUNITE ANTI AIE 188

A) Equidés hyperimmunisés avec le précipitogène G ou C 188

B) Equidés infectés et soumis à des réinoculations 189

1) Epreuve par la souche Wyoming, d'équidés infectés par une souche française 189

.../..

2) Epreuve par une souche française, d'équidés infectés par la souche Wyoming 195

3) Epreuve par la souche Wyoming, d'équidés déjà infectés par la souche Wyoming 198
a) Infection par la souche Wyoming provenant d'un autre cheval 198
b) Infection par la souche Wyoming provenant d'un même cheval 204

C) Equidé infecté et traité par du sérum antilymphocytaire 210

QUATRIEME PARTIE : DISCUSSION GENERALE 213

I/ LES PRECIPITOGENES AIE 215

A) Le précipitogène G 215

1) Production 215
a) Organes d'équidés infectés 215
b) Culture cellulaire 217

2) Isolement et purification 218

3) Propriétés 219

B) Le précipitogène C 221

1) Production 221
a) Organes d'équidés infectés 221
b) Culture cellulaire 222

2) Isolement, purification et propriétés 223

II/ LES PRECIPITINES ANTI AIE 224

A) Etude cinétique des précipitines 224

1) Apparition des précipitines 224
a) Précipitines anti G 224
b) Précipitines anti C 226

2) Evolution des précipitines 227
a) Précipitines anti G 227
b) Précipitines anti C 228

3) Relations avec la cinétique des anticorps révélés par immunofluorescence indirecte 230

4) Relations avec l'évolution des modifications du protéinogramme sérique 231

B) Nature des précipitines 233

1) Précipitines anti G 233
2) Précipitines anti C 235

III/ L'IMMUNITE ANTI AIE 236

A) Equidés hyperimmunisés avec le précipitogène G ou C 237

B) Comportement d'équidés déjà infectés 237
1) Vis-à-vis d'une autre souche 237
2) Vis-à-vis de la même souche 239

CONCLUSION 243

Bibliographie 249

.../..